



Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia

Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal

Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Instituto de la Grasa

Departamento de Biotecnología de Alimentos

Tesis Doctoral

BIOSÍNTESIS, ACUMULACIÓN Y ESTABILIDAD DE CAROTENOIDES EN CEREALES. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TRIGO DURO (*Triticum turgidum*) Y TRITORDEUM (*H. chilense* x *T. turgidum* conv. *durum*).

Memoria presentada por
Dña. Elena Mellado Ortega,
Licenciada en Bioquímica,
para optar al Grado de
Doctor por la Universidad de
Sevilla

Sevilla, Julio 2013

La Tesis Doctoral titulada “**BIOSÍNTESIS, ACUMULACIÓN Y ESTABILIDAD DE CAROTENOIDES EN CEREALES. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TRIGO DURO (*Triticum turgidum*) Y TRITORDEUM (*H. chilense* x *T. turgidum* conv. *durum*)**”, presentada por la Licenciada en Bioquímica **Dña. Elena Mellado Ortega** para optar al Grado de Doctor, ha sido realizada en el Grupo de Química y Bioquímica de Pigmentos del Departamento de Biotecnología de Alimentos (Instituto de la Grasa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas), bajo la dirección del Doctor **D. Dámaso Hornero Méndez**. Considerando que se han alcanzado los objetivos inicialmente previstos, y que el trabajo reúne los requisitos necesarios, se autoriza su presentación.

Sevilla, Julio 2013

El Director

El Tutor

Fdo.: Dámaso Hornero Méndez

Fdo.: Francisco José Heredia Mira

Conforme, la Directora del Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal

Fdo.: Ana María Cameán Fernández

El presente trabajo de investigación se ha realizado en el marco de los proyectos AGL2007-60092 (Esterificación de xantofilas en vegetales como proceso natural determinante de su acumulación in vivo y estabilidad ex vivo) y AGL2010-14850 (Análisis de la esterificación de xantofilas en frutos, semillas y tubérculos) del Plan Nacional de I+D+i (CICYT), y del Proyecto de Excelencia P08-AGR-03477 (Esterificación de xantofilas en vegetales) de la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía, todos ellos dotados de financiación FEDER.

Dña. Elena Mellado Ortega ha disfrutado de una ayuda JAE-Predoc para la realización de Tesis Doctorales en el marco del Programa JAE (Junta de Ampliación de Estudios) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (convocatoria 2007). Dicha ayuda ha estado cofinanciada en el marco del nuevo Programa Operativo FSE2007-2013 Plurirregional de Adaptabilidad y Empleo, dentro del Eje 3 “Aumento y mejora del Capital Humano”, Tema Prioritario 74 “Desarrollar el potencial Humano en el ámbito de la Investigación y la Innovación”.

INDICE GENERAL

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	7
2.1. Los cereales	7
2.1.1. El trigo y resto de cereales. Alimentos básicos de la humanidad.	7
2.1.1.1. Historia, origen y filogenética	11
2.1.1.2. Producción y comercio mundial.	18
2.1.1.3. Botánica, cultivo de la planta y tipos de trigos.	20
2.1.1.4. Composición química y aspectos nutricionales.	27
2.1.1.5. Harinas de cereales: métodos de obtención, procesado y características.	32
2.1.2. Tritordeum: un nuevo cereal de especial relevancia en la mejora vegetal	37
2.1.2.1. Nuevos cultivos anfploides sintéticos: origen de tritordeum.	37
2.1.2.2. Desarrollo agronómico y características fisiológicas.	38
2.1.2.3. Propiedades y calidad harino-panaderas.	41
2.2. Pigmentos carotenoides.	43
2.2.1. Estructura, nomenclatura y propiedades físico-químicas.	43
2.2.2. Presencia, distribución, localización y funciones.	50
2.2.3. Actividades biológicas y nutricionales de los carotenoides en humanos.	54
2.2.4. Bioquímica de la carotenogénesis en plantas.	58
2.2.4.1. Biosíntesis de carotenoides. Genes y enzimas implicados.	59
2.2.4.2. Control de la carotenogénesis: aspectos regulatorios.	70
2.2.5. Catabolismo y acumulación de carotenoides en plantas.	74
2.2.6. Biotecnología de carotenoides: alteración del perfil carotenoide en plantas.	76
2.2.6.1. Estrategias para mejorar el contenido y composición de carotenoides en cultivos vegetales.	76

2.2.6.2. Aplicaciones de la biotecnología de carotenoides en cereales.	80
2.3. Carotenoides en cereales.	83
2.3.1. Composición y distribución de carotenoides.	83
2.3.2. Análisis de carotenoides en cereales.	86
2.3.3. Tecnología de cereales y su influencia sobre el contenido carotenoide en granos y productos derivados.	90
2.3.3.1. Estabilidad de carotenoides durante el almacenamiento poscosecha de granos y harinas.	91
2.3.3.2. Efecto del procesado de cereales sobre el contenido carotenoide.	93
3. OBJETIVOS.....	99
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	103
4.1. Descripción del material vegetal.	103
4.2. Diseños experimentales.....	105
4.2.1. Estudio de la evolución del perfil carotenoide durante el desarrollo del grano y análisis de expresión de genes de la ruta de carotenogénicos.	105
4.2.2. Evolución y estabilidad de pigmentos carotenoides durante el almacenamiento en postrecolección de granos maduros de trigo duro y tritordeum.	106
4.2.3. Estudio preliminar de evolución y estabilidad de pigmentos carotenoides durante el almacenamiento controlado de harinas integrales de trigo duro y tritordeum.	107
4.2.4. Estudio de la evolución y estabilidad de los pigmentos carotenoides durante el almacenamiento prolongado (12 meses) de granos y harinas integrales de trigo duro y tritordeum.....	108
4.3. Determinación de humedad relativa de granos en desarrollo y maduros.	110
4.4. Análisis de pigmentos.....	110
4.4.1. Extracción de pigmentos.....	110
4.4.1.1. Extracción de pigmentos para la identificación, caracterización pormenorizada y cuantificación preliminar del perfil carotenoide en muestras de trigo duro y tritordeum.....	110
4.4.1.2. Extracción y cuantificación de pigmentos (clorofilas y carotenoides) durante el desarrollo de los granos.	111

4.4.1.3. Extracción de pigmentos carotenoides en granos maduros, así como en las muestras de granos y harinas correspondientes a los ensayos de almacenamiento prolongado.....	112
4.4.2. Saponificación de extractos de pigmentos carotenoides.....	116
4.4.3. Síntesis de ésteres de luteína con ácidos grasos.....	116
4.4.4. Identificación de pigmentos carotenoides.....	117
4.4.5. Aislamiento y purificación de patrones de pigmentos.....	120
4.4.6. Separación y cuantificación de pigmentos mediante HPLC.....	121
4.4.6.1. Método rutinario para la separación y cuantificación de pigmentos presentes en granos y harinas de cereal mediante HPLC en fase reversa C18.....	121
4.4.6.2. Análisis de xantofilas libres y esterificadas mediante HPLC en fase reversa C30 y espectrometría de masas (HPLC-MS-(APCl)).....	125
4.5. Análisis de ácidos grasos mediante cromatografía de gases (GC).....	126
4.6. Cálculos de parámetros cinéticos.....	128
4.7. Análisis de expresión de genes carotenogénicos.....	130
4.7.1. Extracción y purificación de RNA total.....	130
4.7.2. Síntesis de cDNA.....	130
4.7.3. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR).....	131
4.7.3.1. Diseño de cebadores.....	131
4.7.3.2. Análisis de expresión mediante qPCR a tiempo real.....	131
4.8. Tratamientos de los resultados y análisis estadístico.....	133
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	137
5.1. Caracterización de la composición carotenoide en granos de tritordeum y trigo duro.....	137
5.1.1. Aislamiento e identificación de pigmentos.....	140
5.1.2. Aislamiento e identificación de regioisómeros de ésteres de luteína en tritordeum.....	155
5.2. Composición cualitativa y cuantitativa de pigmentos carotenoides en granos de trigos y tritordeum.....	176
5.3. Relación entre la composición de ácidos grasos en lípidos totales y esterificación de xantofilas en tritordeum.....	187

5.4. Composición de pigmentos carotenoides en granos de <i>Hordeum chilense</i>	192
5.5. Localización y distribución de pigmentos carotenoides en granos de trigo duro y tritordeum.	197
5.6. Evolución del perfil de pigmentos cloroplásticos durante el desarrollo y la maduración del grano en trigo duro y tritordeum. Análisis de expresión de genes carotenogénicos.	206
5.6.1. Cambios en la composición de pigmentos cloroplásticos durante el desarrollo y maduración del grano de cereal.....	207
5.6.1.1. Desarrollo y maduración del grano de trigo duro y tritordeum.....	207
5.6.1.2. Perfil de pigmentos cloroplásticos durante el desarrollo y maduración de granos de trigo duro y tritordeum.....	214
5.6.2. Análisis de expresión de genes carotenogénicos durante el desarrollo de granos de trigo duro y tritordeum.	233
5.7. Evolución del contenido y composición de pigmentos carotenoides durante el almacenamiento en postcosecha de granos maduros de trigo duro y tritordeum.	240
5.7.1. Evolución y estabilidad de las fracciones de luteína esterificada durante el almacenamiento en postcosecha de granos de tritordeum a distintas temperaturas.....	243
5.8. Estudio preliminar de evolución y estabilidad de pigmentos carotenoides durante el almacenamiento de harinas integrales de trigo duro y tritordeum.	264
5.9. Efecto del almacenamiento prolongado sobre el contenido y estabilidad de los pigmentos carotenoides presentes en granos y harinas integrales de trigo duro y tritordeum.	286
5.9.1. Composición cualitativa y cuantitativa de pigmentos carotenoides en granos de trigos duros y tritordeum sometidos a almacenamiento prolongado.....	287
5.9.2. Evolución del contenido y composición de pigmentos carotenoides durante el almacenamiento prolongado de granos de trigo duro y tritordeum.....	288
5.9.2.1. Evolución y estabilidad de las fracciones de luteína esterificadas durante el almacenamiento prolongado de granos de trigo duro y tritordeum.....	292
5.9.2.2. Estudio cinético de la evolución del contenido y composición de pigmentos carotenoides durante el almacenamiento prolongado de granos de trigo duro y tritordeum.	295

5.9.3. Evolución del contenido y composición de pigmentos carotenoides durante el almacenamiento prolongado de harinas integrales de trigo duro y tritordeum.	316
5.9.3.1. Evolución y estabilidad de las fracciones de luteína esterificada durante el almacenamiento prolongado de harinas de trigo duro y tritordeum.	320
5.9.3.2. Estudio cinético de la evolución del contenido y composición de pigmentos carotenoides durante el almacenamiento prolongado de harinas de trigo duro y tritordeum.	323
5.9.4. Efecto del procesado sobre la evolución del perfil de pigmentos carotenoides durante el almacenamiento prolongado de granos y sus correspondientes harinas en trigo duro y tritordeum.	327
5.9.4.1. Análisis comparativo entre la evolución del contenido y composición de pigmentos carotenoides durante el almacenamiento prolongado de granos y sus correspondientes harinas en trigo duro.	327
5.9.4.2. Análisis comparativo entre la evolución del contenido y composición de pigmentos carotenoides durante el almacenamiento prolongado de granos y sus correspondientes harinas en tritordeum.	332
6. CONCLUSIONES	357
7. ANEXO	363
8. BIBLIOGRAFÍA	409

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Principales cereales domesticados y utilizados en agricultura. Trigo (<i>Triticum</i> spp.) (A), Arroz (<i>Oryza sativa</i>) (B), Maíz (<i>Zea mays</i>) (C), Cebada (<i>Hordeum vulgare</i>) (D), Centeno (<i>Secale cereale</i>) (E), Triticale (x <i>Triticosecale</i> Wittmack) (F).....	9
Figura 2. Cereales de menor importancia en cuanto a su producción. Avena (<i>Avena sativa</i>) (A), sorgo (<i>Sorghum bicolor</i>) (B) y mijo (<i>Panicum miliaceum</i>) (C).	10
Figura 3. Espiga de tritordeum (<i>H. chilense</i> x <i>T. turgidum</i> conv. <i>Durum</i>).....	11
Figura 4. La domesticación de los cereales..	12
Figura 5. Utensilios y dispositivos usados para moler las semillas de cereales a lo largo de la historia.	13
Figura 6. Evolución durante la domesticación del trigo (Mangelsdorf, 1953).	15
Figura 7. Espigas y granos de trigos Einkorn, Emmer y Spelt	16
Figura 8. Espigas de <i>Triticum urartu</i> L. (A); Espigas de <i>Aegilops speltoides</i> . (B); Espigas de <i>Aegilops tauschii</i> (C).	16
Figura 9. Evolución de la producción y consumo mundial de trigo en el periodo 1961-2007 (Fuente: FAOSTAT).	19
Figura 10. Evolución de la producción de trigo en los principales países productores en el periodo 1961-2011. (Fuente: FAOSTAT).....	20
Figura 11. Espigas de trigo y estructura del raquis.....	21
Figura 12. Detalle de una espiguilla de trigo compuesta por cinco antecios.	21
Figura 13. Componentes de una espiguilla de trigo.	21
Figura 14. Estructura de un antecio de trigo.....	22
Figura 15. Estructura del grano (cariópse) de trigo.....	23
Figura 16. Etapas del desarrollo de la planta de trigo.....	24
Figura 17. Esquema de la molienda secuencial con cilindros (<i>Sistema Húngaro</i>).	35
Figura 18. Protocolo de obtención de Tritordeum.....	40
Figura 19. Granos de <i>H. chilense</i> , trigo duro y tritordeum hexaploide.	40
Figura 20. Esqueleto C40 y sistema de numeración de carotenoides.	44
Figura 21. Estructuras químicas de grupos terminales encontrados en carotenoides.....	45

Figura 22. Carotenos y xantofilas comúnmente presentes en frutos y vegetales.....	46
Figura 23. Relación entre estructura (cromóforo) de pigmentos carotenoides, espectro de absorción de luz visible y color.	47
Figura 24. Espectro de absorción de luz ultravioleta-visible (UV-visible) típico de pigmentos carotenoides.....	48
Figura 25. Efecto de diversas modificaciones estructurales de carotenoides sobre el espectro de absorción de luz ultravioleta-visible (UV-visible).	49
Figura 26. Fotografías al microscopio electrónico de cloroplastos y cromoplastos de frutos de pimiento verde y rojo respectivamente.	51
Figura 27. Mecanismo de metabolización de β -caroteno en retinol por rotura central mediada por la enzima β -caroteno-15,15'-dioxigenasa intestinal.....	55
Figura 28. Esquema general de la biosíntesis de isoprenoides.	59
Figura 29. Esquema general de la carotenogénesis en plantas superiores..	61
Figura 30. Ruta MEP (2-C-metil-DEritriol-4-fosfato). Biosíntesis de los precursores IPP (isopentenil difosfato) y DMAPP (dimetil alilo difosfato) de la ruta de los isoprenoides en plantas superiores.	62
Figura 31. Síntesis de geranilgeranil difosfato (GGPP) por acción de preniltransferasas y geranilgeranil difosfato sintasa (GGPS).	63
Figura 32. Síntesis de fitoeno por condensación de dos moléculas de geranilgeranil difosfato (GGPP) por acción de fitoeno sintasa (PSY).....	63
Figura 33. Formación de licopeno a partir de fitoeno por acción de desaturasas (fitoeno desaturasa, PDS; ζ -caroteno desaturasa, ZDS).....	65
Figura 34. Efecto de la extensión del cromóforo, espectro de UV-visible y color como consecuencia de las desaturaciones sucesivas mediadas por fitoeno desaturasa (PDS) y ζ -caroteno desaturasa (ZDS)..	65
Figura 35. Ciclación de los extremos de la molécula de licopeno por acción de licopeno- β -ciclaza (LYCB) y licopeno- ϵ -ciclaza (LYCE). Origen de las ramas β,β y β,ϵ de la ruta carotenogénica.	68
Figura 36. Regulación de la ruta carotenogénica.	74
Figura 37. Granos de arroz tradicional y de <i>Golden Rice 2</i>	79
Figura 38. Fotografías de los granos de las variedades/líneas de trigo duro y tritordeum estudiadas.	104
Figura 39. Variedades de trigo duro y tritordeum empleadas en el presente trabajo de investigación con indicación de los experimentos en los que se han usado.	105

Figura 40. Diseño experimental para el análisis de evolución de pigmentos y expresión de genes carotenogénicos durante el desarrollo y maduración del grano.....	106
Figura 41. Diseño experimental para el análisis de evolución de pigmentos carotenoides durante el almacenamiento en postcosecha de granos maduros.	107
Figura 42. Diseño experimental para el análisis de evolución y estabilidad de los pigmentos carotenoides durante el almacenamiento de harinas integrales de trigo duro y tritordeum.	108
Figura 43. Diseño experimental para el análisis de evolución y estabilidad de los pigmentos carotenoides durante el almacenamiento de granos de trigo duro (variedad Don Pedro) y tritordeum (línea HT621).	109
Figura 44. Diseño experimental para el análisis de evolución y estabilidad de los pigmentos carotenoides durante el almacenamiento de harina integrales de trigo duro (variedad Don Pedro) y tritordeum (línea HT621).	110
Figura 45. Esquema del protocolo general de extracción de pigmentos carotenoides a partir de granos y harinas de trigo duro y tritordeum utilizados para la identificación y caracterización, así como en los ensayos de almacenamiento en postrecolección de granos maduros, y de almacenamiento corto de harinas.....	113
Figura 46. Esquema del protocolo de extracción de pigmentos cloroplásticos a partir de granos en desarrollo.....	114
Figura 47. Esquema del protocolo de extracción de pigmentos carotenoides a partir de granos maduros procedentes de los ensayos de desarrollo de grano, así como los granos y harinas de los experimentos de almacenamiento prolongado.	115
Figura 48. Equipo de molienda Retsch MM400 (A), tarros (25 mL) y bolas de acero inoxidable (15 mm) empleados para la extracción de carotenoides asistida por molienda (B).	116
Figura 49. Esquema de la reacción de la reorganización interna del grupo funcional 5,6-epóxido a grupo 5,8-epóxido catalizada por medio ácido.	118
Figura 50. Prueba de grupo funcional 5,6-epóxido.....	118
Figura 51. Esquema de la reacción de la reducción de grupo carbonilo a grupo hidroxilo en presencia de NaBH ₄ o LiAlH ₄	119
Figura 52. Prueba de grupo funcional carbonilo.	119
Figura 53. Esquema de la reacción de acetilación (esterificación) de un grupo hidroxilo en la posición 3 de un anillo β- terminal.....	120

Figura 54. Equipo de cromatografía líquida de alta resolución (Waters 2695 Alliance) con detector espectrofotométrico DAD UV-visible (Waters 2998).....	123
Figura 55. Equipo de cromatografía líquida de alta resolución (Waters 2695 Alliance) acoplado en serie a un detector DAD UV-visible de diodos (Waters 996) y a un detector de espectrometría de masas (Micromass ZMD4000) con sonda APCI.	126
Figura 56. Equipo de cromatografía de gases (Agilent 7890A) dotado de detector de ionización de llama (FID) para en análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES).....	128
Figura 57. Cromatogramas de HPLC correspondiente a extractos directos de pigmentos carotenoides obtenidos de granos de tritordeum de la línea HT609 (A) y de trigo duro de la variedad Simeto (B).	141
Figura 58. Cromatograma de HPLC correspondiente al perfil de pigmentos carotenoides resultante tras la saponificación con KOH-MeOH 10% (p/v) de un extracto de granos de tritordeum de la línea HT609.....	142
Figura 59. Espectro de absorción UV-visible de all- <i>trans</i> -luteína (pico 2) en el eluyente cromatográfico.	145
Figura 60. Ensayo de acetilación de luteína. Los cromatogramas A y B se corresponden con la muestra antes y después del ensayo, respectivamente..	146
Figura 61. Espectro de masas (APCI-MS (+)) y patrón de fragmentación de all- <i>trans</i> -luteína (3,3'-diol- β,ϵ -caroteno) (pico 2, Rt=9.84 minutos).	147
Figura 62. Espectros de absorción UV-visible de all- <i>trans</i> -luteína, 9- <i>cis</i> -luteína y 13- <i>cis</i> -luteína (picos 2, 3 y 4, respectivamente).	148
Figura 63. Espectro de absorción UV-visible de all- <i>trans</i> -zeaxanteno (pico 1) en el eluyente cromatográfico.	149
Figura 64. Ensayo de acetilación zeaxanteno. Los cromatogramas A y B se corresponden con la muestra antes y después del ensayo, respectivamente.	150
Figura 65. Espectro de masas (APCI-MS (+)) y patrón de fragmentación de all- <i>trans</i> - zeaxanteno (3,3'-diol- β,β -caroteno) (pico 1, Rt=9.62 minutos) aislado de granos de trigo duro.....	151
Figura 66. Espectros de absorción UV-visible de all- <i>trans</i> - α -caroteno (–; pico 7, Rt=16.85 minutos) y all- <i>trans</i> - β -caroteno (–; pico 8, Rt=17.05 minutos) en el eluyente cromatográfico.	152
Figura 67. Espectros de masas de all- <i>trans</i> - α -caroteno (–; pico 7, Rt=16.85 minutos) y all- <i>trans</i> - β -caroteno (–; pico 8, Rt=17.05 minutos) obtenidos mediante la técnica HPLC-MS (APCI-MS (+)).	153

Figura 68. Estructura de los carotenos y xantofilas libres presentes en granos de tritordeum y trigo duro.	154
Figura 69. Formación de cationes en las posiciones 3 y 3', tras la pérdida neutra de una molécula de agua durante la protonación y fragmentación en condiciones APCI(+) a partir de un anillo 3-OH- β - y 3'-OH- ϵ -, respectivamente.	157
Figura 70. Mecanismo de fragmentación en condiciones ionización química a presión atmosférica (APCI) y pérdida neutra de un grupo acilo esterificando a luteína en la posición 3'.	157
Figura 71. Patrón de fragmentación y espectro de masas (APCI-MS (+)) del regioisómero luteína-3'- <i>O</i> -acilo. AciloE: grupo acilo en posición 3' del anillo ϵ -.	159
Figura 72. Patrón de fragmentación y espectro de masas (APCI-MS (+)) del regioisómero luteína-3- <i>O</i> -acilo. AciloB: grupo acilo en posición 3 del anillo β -.	159
Figura 73. Patrón de fragmentación y espectro de masas (APCI-MS (+)) del regioisómero luteína-3- <i>O</i> -acilo1B-3'- <i>O</i> -acilo2E (Heterodiester; acilo1 \neq acilo2). AciloB: grupo acilo en posición 3 del anillo β -; AciloE: grupo acilo en posición 3' del anillo ϵ -.	160
Figura 74. Patrón de fragmentación y espectro de masas (APCI-MS (+)) del regioisómero luteína-3- <i>O</i> -acilo2B-3'- <i>O</i> -acilo1E (Heterodiester; acilo1 \neq acilo2). AciloB: grupo acilo en posición 3 del anillo β -; AciloE: grupo acilo en posición 3' del anillo ϵ -.	160
Figura 75. Patrón de fragmentación y espectro de masas (APCI-MS (+)) del homodiester de luteína (luteína-3- <i>O</i> -aciloB-3'- <i>O</i> -aciloE (Homodiester; aciloB=aciloE). AciloB: grupo acilo en posición 3 del anillo β -; AciloE: grupo acilo en posición 3' del anillo ϵ -.	161
Figura 76. Fracciones de monoésteres y diésteres aisladas de un extracto concentrado de tritordeum mediante cromatografía reversa C18, y cromatografiadas mediante fase reversa C30. Detección UV-visible a 450 nm.	162
Figura 77. Espectros de masas (APCI, modo positivo) de los regioisómeros de luteína monoéster correspondientes a la fracción luteína monoéster 1. El pico a 30.76 minutos se asigna estructuralmente como luteína-3'- <i>O</i> -linoleato, y el pico a 31.72 minutos como luteína-3- <i>O</i> -linoleato.	165
Figura 78. Espectros de masas (APCI, modo positivo) de los regioisómeros de luteína monoéster correspondientes a la fracción luteína monoéster 2. El pico a 36.09 minutos se asigna estructuralmente como luteína-3'- <i>O</i> -palmitato, y el pico a 38.40 minutos como luteína-3- <i>O</i> -palmitato.	166
Figura 79. Espectro de masas (APCI, modo positivo) del diéster correspondiente a la fracción luteína diéster 1. Se asigna estructuralmente como luteína dilinoleato.	167

Figura 80. Espectros de masas (APCI, modo positivo) de los regioisómeros de luteína diéster correspondientes a la fracción luteína diéster 2. El pico a 49.38 minutos se asigna estructuralmente como luteína-3'- <i>O</i> -linoleato-3- <i>O</i> -palmitato, y el pico a 50.14 minutos como luteína-3'- <i>O</i> -palmitato-3- <i>O</i> -linoleato.	168
Figura 81. Espectro de masas (APCI, modo positivo) del diéster correspondiente a la fracción luteína diéster 3. Se asigna estructuralmente como luteína dipalmitato.	169
Figura 82. Cromatogramas correspondientes a la separación en fase reversa C18 de los productos resultantes de la esterificación de luteína con ácido linoleico (A), ácido palmítico (B) y la mezcla de ambos ácidos..	170
Figura 83. Cromatogramas correspondientes a la separación en fase reversa C30 de los productos resultantes de la esterificación de luteína con ácido linoleico (A), ácido palmítico (B) y la mezcla de ambos ácidos	171
Figura 84. Estructura de los distintos regioisómeros de monoésteres de luteína presentes en tritordeum.....	174
Figura 85. Estructura de homodímeros y regioisómeros de diésteres de luteína presentes en tritordeum.....	175
Figura 86. Contenido carotenoide total (µg/g) presente en granos de las variedades de trigo duro (Don Pedro, Simeto y Claudio) y de las líneas avanzadas de tritordeum (HT630, HT621 y HT609).....	176
Figura 87. Ruta de biosíntesis y perfil de carotenoides en granos de trigo duro y tritordeum.	179
Figura 88. Distribución media de las fracciones de luteína libre y esterificada (monoésteres y diésteres) en granos de tritordeum.	180
Figura 89. Rutas de formación de regioisómeros de monoésteres y diésteres de luteína con ácidos palmítico (P) y linoléico (L). 3- <i>O</i> -P: incorporación de ácido palmítico en la posición 3; 3'- <i>O</i> -P: incorporación de ácido palmítico en la posición 3'; 3- <i>O</i> -L: incorporación de ácido linoleico en la posición 3; 3'- <i>O</i> -L: incorporación de ácido linoleico en la posición 3'.....	182
Figura 90. Proyecciones de los autovectores de cada variable sobre el plano definido por los componentes principales PC1 y PC2.....	185
Figura 91. Análisis de componentes principales (PCA) del contenido de pigmentos carotenoides individuales en trigo duro y tritordeum. Representación de los factores PC1 y PC2.	186
Figura 92. Cromatogramas correspondientes al análisis de ácidos grasos (ésteres metílicos; FAMES) mediante cromatografía de gases en muestras de trigo (variedad Don Pedro), tritordeum (línea HT630) y mezcla patrón C8-C22..	188

Figura 93. Estructuras de monogalactosil diacilglicerol (MGDG) y digalactosil diacilglicerol (DGDG). R1 y R2 corresponden a ácidos grasos.....	191
Figura 94. Planta de cebada silvestre (<i>H. chilense</i>) con espigas maduras (A) y granos (B) del registro PI 531781 (NSGC, USDA).....	192
Figura 95. Cromatograma correspondiente a la separación en fase reversa C18 de los pigmentos carotenoides extraídos de granos de <i>Hordeum chilense</i> (reg. PI531781).	193
Figura 96. Distribución de las fracciones de luteína libre y esterificada (monoésteres y diésteres) en granos de <i>H. chilense</i> (PI 531781). Los datos representan los valores medios para cuatro determinaciones (n=4).	196
Figura 97. Partes principales del grano de cereal (A) y granos (B) de trigo duro (variedad Simeto) y tritordeum (línea HT621).	197
Figura 98. Cromatogramas de HPLC correspondiente a extractos de pigmentos carotenoides obtenidos de las fracciones de embrión y endospermo aisladas de granos de trigo duro (variedad Simeto) y tritordeum (línea HT621). Detección a 450 nm.	201
Figura 99. Contenido y relación de monoésteres de luteína y sus regioisómeros presentes en el embrión y endospermo de tritordeum (línea HT621).	203
Figura 100. Composición de ácidos grasos en las fracciones de endospermo y embrión de trigo duro (variedad Simeto) y tritordeum (línea HT621).....	204
Figura 101. Esquema cronológico del crecimiento de la planta de cereal, indicando el código Zadoks correspondiente.	207
Figura 102. Imágenes de los estados de desarrollo de granos de trigo duro y tritordeum analizados en el presente estudio. E1 (8 DDA), E2 (14 DDA), E3 (18 DDA), E4 (25 DDA) y EF (maduro, harvest).	209
Figura 103. Evolución del peso (mg) y contenido en humedad (%) de los granos de trigo duro y tritordeum durante el desarrollo y maduración.	210
Figura 104. Evolución del peso (mg) y contenido en humedad (%) de los granos de cada variedad de trigo duro y tritordeum durante el desarrollo y maduración.	212
Figura 105. Cromatogramas de HPLC correspondientes al perfil de pigmentos cloroplásticos durante el desarrollo de granos de trigo duro (Don Pedro) y tritordeum (HT630).....	213
Figura 106. Estructura de los pigmentos cloroplásticos presentes en los granos de cereal en desarrollo.	215
Figura 107. Evolución del contenido de clorofilas y carotenoides durante el desarrollo y maduración de granos de tritordeum (HT630) y trigo duro (Don Pedro) en función del sistema de expresión de concentración en base a peso de	

muestra ($\mu\text{g/g}$) y por unidad de grano ($\mu\text{g/grano}$), tanto en base fresca (PF) como seca (PS).....	216
Figura 108. Evolución del contenido ($\mu\text{g/grano PS}$) de clorofilas y carotenoides durante el desarrollo y posterior maduración de granos de trigo duro y tritordeum.	219
Figura 109. Evolución de la relación entre el contenido clorofilas totales y carotenoides totales durante el desarrollo y maduración de granos de trigo duro y tritordeum.	220
Figura 110. Tasas de formación neta normalizada de pigmentos clorofílicos y carotenoides ($\Delta\text{Contenido normalizado } (\mu\text{g/grano PS})/\text{duración etapa (días)}$) referidos a las etapas de desarrollo comprendidas entre estadios consecutivos ($E1 \rightarrow E2$; $E2 \rightarrow E3$; $E3 \rightarrow E4$).	221
Figura 111. Correlación entre el contenido carotenoide presente en los granos al final del desarrollo (estadio $E4$; 25 DDA) y en los correspondientes granos maduros (estadio EF).	222
Figura 112. Evolución de la composición porcentual de carotenoides y clorofilas individuales durante el desarrollo de granos de trigo duro y tritordeum.....	223
Figura 113. Cambios en la concentración ($\mu\text{g/grano PS}$) de pigmentos clorofílicos individuales, y relación entre los mismos, durante el desarrollo y maduración de granos de trigo duro y tritordeum.	224
Figura 114. Tasas de formación neta normalizada de clorofilas <i>a</i> y <i>b</i> en relación a las etapas de desarrollo comprendidas entre estadios consecutivos ($E1 \rightarrow E2$; $E2 \rightarrow E3$; $E3 \rightarrow E4$).	225
Figura 115. Cambios en la concentración ($\mu\text{g/grano PS}$) de pigmentos carotenoides individuales durante el desarrollo y maduración de granos de trigo duro y tritordeum.	228
Figura 116. Tasas de formación neta normalizada de los pigmentos carotenoides individuales en relación a las etapas de desarrollo comprendidas entre estadios consecutivos ($E1 \rightarrow E2$; $E2 \rightarrow E3$; $E3 \rightarrow E4$).	229
Figura 117. Evolución de la relación entre los carotenoides de las ramas $\beta\epsilon$ y $\beta\beta$ de la ruta carotenogénica durante el desarrollo y maduración de granos de trigo duro y tritordeum.	231
Figura 118. Evolución del perfil de transcritos (expresión génica relativa) de nueve genes (<i>Dxr</i> , <i>Hdr</i> , <i>Ggpps1</i> , <i>Psy1</i> , <i>Psy2</i> , <i>Pds</i> , <i>Zds</i> , βLCY y ϵLCY) pertenecientes a la ruta de los isoprenoides (ruta MEP) y a la ruta de carotenogénesis durante el desarrollo de granos de trigo duro y tritordeum.....	234
Figura 119. Esquema simplificado de las rutas MEP y carotenogénica de plantas superiores con indicación de las enzimas correspondientes codificadas por los genes estudiados	235

Figura 120. Evolución del contenido carotenoides total ($\mu\text{g/g}$) presente en las variedades de trigo (Don Pedro, Simeto y Claudio) y en las líneas avanzadas de tritordeum (HT630, HT621 y HT609), durante el almacenamiento de las semillas a 4, 20 y 37°C.....	247
Figura 121. Evolución del perfil cromatográfico de pigmentos carotenoides presentes en granos de tritordeum (HT621) y trigo duro (Don Pedro) durante el almacenamiento en postrecolección a 4, 20 y 37°C.	248
Figura 122. Evolución del contenido ($\mu\text{g/g}$) en carotenoides individuales (<i>all-trans</i> -zeaxanteno, <i>all-trans</i> -luteína, <i>cis</i> -luteína, α -caroteno y β -caroteno) presentes en los granos de la variedad Don Pedro de trigo duro, durante el almacenamiento de las semillas a 4, 20 y 37°C.	249
Figura 123. Evolución del contenido ($\mu\text{g/g}$) en carotenoides individuales (<i>all-trans</i> -zeaxanteno, <i>all-trans</i> -luteína, <i>cis</i> -luteína, α -caroteno y β -caroteno) presentes en los granos de la variedad Simeto de trigo duro, durante el almacenamiento de las semillas a 4, 20 y 37°C	250
Figura 124. Evolución del contenido ($\mu\text{g/g}$) en carotenoides individuales (<i>all-trans</i> -zeaxanteno, <i>all-trans</i> -luteína, <i>cis</i> -luteína, α -caroteno y β -caroteno) presentes en los granos de la variedad Claudio de trigo duro, durante el almacenamiento de las semillas a 4, 20 y 37°C.	251
Figura 125. Evolución del contenido ($\mu\text{g/g}$) en carotenoides individuales (<i>all-trans</i> -luteína, <i>cis</i> -luteína y β -caroteno) y fracciones esterificadas de luteína (monoésteres, diésteres y ésteres totales) presentes en los granos de la línea HT630 de tritordeum, durante el almacenamiento de las semillas a 4, 20 y 37°C.....	252
Figura 126. Evolución del contenido ($\mu\text{g/g}$) en carotenoides individuales (<i>all-trans</i> -luteína, <i>cis</i> -luteína y β -caroteno) y fracciones esterificadas de luteína (monoésteres, diésteres y ésteres totales) presentes en los granos de la línea HT621 de tritordeum, durante el almacenamiento de las semillas a 4, 20 y 37°C.....	253
Figura 127. Evolución del contenido ($\mu\text{g/g}$) en carotenoides individuales (<i>all-trans</i> -luteína, <i>cis</i> -luteína y β -caroteno) y fracciones esterificadas de luteína (monoésteres, diésteres y ésteres totales) presentes en los granos de la línea HT609 de tritordeum, durante el almacenamiento de las semillas a 4, 20 y 37°C.....	254
Figura 128. Efecto de la temperatura (4, 20 y 37°C) sobre el grado de esterificación de luteína durante el almacenamiento de semillas de tritordeum (líneas HT630, HT621 y HT609). Para cada variedad, los datos expresan la contribución porcentual de cada fracción (libre, monoesterificada y diesterificada) en función de la temperatura y el tiempo de almacenamiento.	255
Figura 129. Evolución individual del contenido ($\mu\text{g/g}$) en monoésteres y diésteres de luteína presentes en los granos de la línea HT630 de tritordeum, durante el almacenamiento de las semillas a 4, 20 y 37°C.....	256

Figura 130. Evolución individual del contenido ($\mu\text{g/g}$) en monoésteres y diésteres de luteína presentes en los granos de la línea HT621 de tritordeum, durante el almacenamiento de las semillas a 4, 20 y 37°C.....	257
Figura 131. Evolución individual del contenido ($\mu\text{g/g}$) en monoésteres y diésteres de luteína presentes en los granos de la línea HT609 de tritordeum, durante el almacenamiento de las semillas a 4, 20 y 37°C.....	258
Figura 132. Cambios en el contenido de regiosómeros de luteína monolinoleato y luteína monopalmitato durante el almacenamiento de granos de tritordeum (HT630) a 4, 20 y 37°C.....	259
Figura 133. Cambios en el contenido de regiosómeros de luteína monolinoleato y luteína monopalmitato durante el almacenamiento de granos de tritordeum (HT621) a 4, 20 y 37°C.....	260
Figura 134. Cambios en el contenido de regiosómeros de luteína monolinoleato y luteína monopalmitato durante el almacenamiento de granos de tritordeum (HT609) a 4, 20 y 37°C.....	261
Figura 135. Evolución del contenido total de ácidos grasos ($\mu\text{g/g}$) presente en las variedades de trigo (Don Pedro, Simeto y Claudio) y en las líneas avanzadas de tritordeum (HT630, HT621 y HT609) durante el almacenamiento en postcosecha de los granos a 4, 20 y 37°C.....	262
Figura 136. Evolución del contenido ($\mu\text{g/g}$) en ácido palmítico y ácido linoleico en las líneas avanzadas de tritordeum (HT630, HT621 y HT609) durante el almacenamiento en postcosecha de los granos a 4, 20 y 37°C.	263
Figura 137. Evolución del contenido carotenoide total ($\mu\text{g/g}$) presente en harinas integrales de trigo (variedades Don Pedro, Simeto y Claudio) y tritordeum (variedades HT630, HT621 y HT609), durante el almacenamiento de harinas a 4, 20, 37 y 50°C.....	267
Figura 138. Evolución del perfil cromatográfico de pigmentos carotenoides presentes en harinas integrales de tritordeum (HT621) y trigo duro (Don Pedro) durante el almacenamiento a 4, 20, 37 y 50°C.	268
Figura 139. Evolución del contenido ($\mu\text{g/g}$) en carotenoides individuales (all- <i>trans</i> -zeaxanteno, all- <i>trans</i> -luteína, <i>cis</i> -luteína, α -caroteno y β -caroteno) presentes en la harina de la variedad Don Pedro de trigo duro, durante el almacenamiento a 4, 20, 37 y 50°C.....	273
Figura 140. Evolución del contenido ($\mu\text{g/g}$) en carotenoides individuales (all- <i>trans</i> -zeaxanteno, all- <i>trans</i> -luteína, <i>cis</i> -luteína, α -caroteno y β -caroteno) presentes en la harina de la variedad Simeto de trigo duro, durante el almacenamiento a 4, 20, 37 y 50°C.....	274
Figura 141. Evolución del contenido ($\mu\text{g/g}$) en carotenoides individuales (all- <i>trans</i> -zeaxanteno, all- <i>trans</i> -luteína, <i>cis</i> -luteína, α -caroteno y β -caroteno) presentes en	

la harina de la variedad Claudio de trigo duro, durante el almacenamiento a 4, 20, 37 y 50°C.....	275
Figura 142. Evolución del contenido (µg/g) en carotenoides individuales (all- <i>trans</i> -luteína, <i>cis</i> -luteína y β-caroteno) y fracciones esterificadas de luteína (monoésteres, diésteres y ésteres totales) presentes en harinas de la línea HT630 de tritordeum, durante el almacenamiento a 4, 20, 37 y 50°C.	276
Figura 143. Evolución del contenido (µg/g) en carotenoides individuales (all- <i>trans</i> -luteína, <i>cis</i> -luteína y β-caroteno) y fracciones esterificadas de luteína (monoésteres, diésteres y ésteres totales) presentes en harinas de la línea HT621 de tritordeum, durante el almacenamiento a 4, 20, 37 y 50°C.	277
Figura 144. Evolución del contenido (µg/g) en carotenoides individuales (all- <i>trans</i> -luteína, <i>cis</i> -luteína y β-caroteno) y fracciones esterificadas de luteína (monoésteres, diésteres y ésteres totales) presentes en harinas de la línea HT609 de tritordeum, durante el almacenamiento a 4, 20, 37 y 50°C.	278
Figura 145. Efecto de la temperatura (4, 20 37 y 50°C) sobre el grado de esterificación de luteína durante el almacenamiento de harinas de tritordeum (líneas HT630, HT621, HT609).....	279
Figura 146. Evolución individual del contenido (µg/g) en monoésteres y diésteres de luteína presentes en la harina de la línea HT630 de tritordeum, durante el almacenamiento a 4, 20, 37 y 50°C.	280
Figura 147. Evolución individual del contenido (µg/g) en monoésteres y diésteres de luteína presentes en la harina de la línea HT621 de tritordeum, durante el almacenamiento a 4, 20, 37 y 50°C.	281
Figura 148. Evolución individual del contenido (µg/g) en monoésteres y diésteres de luteína presentes en la harina de la línea HT609 de tritordeum, durante el almacenamiento a 4, 20, 37 y 50°C.	282
Figura 149. Cambios en el contenido de regiosómeros de luteína monolinoleato y luteína monopalmitato durante el almacenamiento de harinas integrales de tritordeum (HT630) a 4, 20, 37 y 50°C.	283
Figura 150. Cambios en el contenido de regiosómeros de luteína monolinoleato y luteína monopalmitato durante el almacenamiento de harinas integrales de tritordeum (HT621) a 4, 20, 37 y 50°C.	284
Figura 151. Cambios en el contenido de regiosómeros de luteína monolinoleato y luteína monopalmitato durante el almacenamiento de harinas integrales de tritordeum (HT609) a 4, 20, 37 y 50°C.	285
Figura 152. Evolución del contenido carotenoide total (µg/g) presente en granos de tritordeum (HT621) y trigo duro (Don Pedro) durante el almacenamiento prolongado (12 meses) a -32, 6, 20, 37 y 50°C.....	299

Figura 153. Registro de temperaturas (-32, 6, 20, 37 y 50°C) impuestas durante el almacenamiento prolongado (12 meses) de granos de tritordeum (HT621) y trigo duro (Don Pedro).....	299
Figura 154. Evolución del perfil cromatográfico de pigmentos carotenoides presentes en granos de tritordeum (HT621) y trigo duro (Don Pedro) durante el almacenamiento prolongado (12 meses) a -32, 6, 20, 37 y 50°C.....	300
Figura 155. Evolución del contenido (µg/g) en carotenoides individuales (all- <i>trans</i> -luteína, <i>cis</i> -luteína zeaxanteno y β-caroteno) y fracciones esterificadas de luteína (monoésteres, diésteres y ésteres totales) presentes en granos de trigo duro (Don Pedro) durante el almacenamiento prolongado (12 meses) a -32, 6, 20, 37 y 50°C.	301
Figura 156. Efecto de la temperatura (-32, 6, 20 37 y 50°C) sobre el grado de esterificación de luteína durante el almacenamiento prolongado (12 meses) de granos de tritordeum (HT621) y trigo duro (Don Pedro).....	302
Figura 157. Evolución del contenido (µg/g) en carotenoides individuales (all- <i>trans</i> -luteína, <i>cis</i> -luteína y β-caroteno) y fracciones esterificadas de luteína (monoésteres, diésteres y ésteres totales) presentes en granos de tritordeum (HT621) durante el almacenamiento prolongado (12 meses) a -32, 6, 20, 37 y 50°C.	303
Figura 158. Evolución individual del contenido (µg/g) en monoésteres y diésteres de luteína presentes presentes en granos de trigo duro (Don Pedro) durante el almacenamiento prolongado (12 meses) a -32, 6, 20, 37 y 50°C.....	304
Figura 159. Cambios en los ratios de las fracciones de luteína monesterificada y los correspondientes regioisómeros presentes en granos de tritordeum (HT621) y trigo duro (Don Pedro) durante el almacenamiento prolongado (12 meses) a -32, 6, 20, 37 y 50°C.	305
Figura 160. Cambios en el contenido de regioisómeros de luteína monolinoleato y luteína monopalmitato presentes en granos de trigo duro (Don Pedro) durante el almacenamiento prolongado (12 meses) a -32, 6, 20, 37 y 50°C.....	306
Figura 161. Evolución individual del contenido (µg/g) en monoésteres y diésteres de luteína presentes presentes en granos de tritordeum (HT621) durante el almacenamiento prolongado (12 meses) a -32, 6, 20, 37 y 50°C.....	307
Figura 162. Cambios en el contenido de regioisómeros de luteína monolinoleato y luteína monopalmitato presentes en granos de tritordeum (HT621) durante el almacenamiento prolongado (12 meses) a -32, 6, 20, 37 y 50°C.....	308
Figura 163. Evolución del contenido carotenoide total (µg/g) presente en harinas integrales de tritordeum (HT621) y trigo duro (Don Pedro) durante el almacenamiento prolongado (12 meses) a -32, 6, 20, 37 y 50°C.....	337

Figura 164. Evolución del perfil cromatográfico de pigmentos carotenoides presentes en harinas integrales de tritordeum (HT621) y trigo duro (Don Pedro) durante el almacenamiento prolongado (12 meses) a -32, 6, 20, 37 y 50°C.	338
Figura 165. Evolución del contenido (µg/g) en carotenoides individuales (all- <i>trans</i> -luteína, <i>cis</i> -luteína zeaxanteno y β-caroteno) y fracciones esterificadas de luteína (monoésteres, diésteres y ésteres totales) presentes en harinas integrales de trigo duro (Don Pedro) durante el almacenamiento prolongado (12 meses) a -32, 6, 20, 37 y 50°C.....	339
Figura 166. Efecto de la temperatura (-32, 6, 20 37 y 50°C) sobre el grado de esterificación de luteína durante el almacenamiento prolongado (12 meses) de harinas integrales de tritordeum (HT621) y trigo duro (Don Pedro).....	340
Figura 167. Evolución del contenido (µg/g) en carotenoides individuales (all- <i>trans</i> -luteína, <i>cis</i> -luteína y β-caroteno) y fracciones esterificadas de luteína (monoésteres, diésteres y ésteres totales) presentes en harinas integrales de tritordeum (HT621) durante el almacenamiento prolongado (12 meses) a -32, 6, 20, 37 y 50°C.	341
Figura 168. Evolución individual del contenido (µg/g) en monoésteres y diésteres de luteína presentes presentes en harinas integrales de trigo duro (Don Pedro) durante el almacenamiento prolongado (12 meses) a -32, 6, 20, 37 y 50°C.	342
Figura 169. Cambios en los ratios de las fracciones de luteína monesterificada y los correspondientes regioisómeros presentes en harinas integrales de tritordeum (HT621) y trigo duro (Don Pedro) durante el almacenamiento prolongado (12 meses) a -32, 6, 20, 37 y 50°C.....	343
Figura 170. Cambios en el contenido de regioisómeros de luteína monolinoleato y luteína monopalmitato presentes en harinas integrales de trigo duro (Don Pedro) durante el almacenamiento prolongado (12 meses) a -32, 6, 20, 37 y 50°C.	344
Figura 171. Evolución individual del contenido (µg/g) en monoésteres y diésteres de luteína presentes presentes en harinas integrales de tritordeum (HT621) durante el almacenamiento prolongado (12 meses) a -32, 6, 20, 37 y 50°C.	345
Figura 172. Cambios en el contenido de regioisómeros de luteína monolinoleato y luteína monopalmitato presentes en harinas integrales de tritordeum (HT621) durante el almacenamiento prolongado (12 meses) a -32, 6, 20, 37 y 50°C.	346

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Intervalos de variación en la concentración (%) de los principales componentes del trigo.	27
Tabla 2. Composición nutricional de la harina de trigo (por 100 g de producto).	30
Tabla 3. Coeficientes de extinción específico ($A_{1cm}^{1\%}$) empleados para la cuantificación de las soluciones patrón de pigmentos de referencia.	121
Tabla 4. Gradiente de elución binario empleado para el análisis rutinario de carotenoides en granos y harinas de cereal mediante HPLC en fase reversa C18.	123
Tabla 5. Gradiente de elución binario empleado para el análisis de los pigmentos cloroplásticos (clorofilas y carotenoides) en las muestras de granos en desarrollo mediante HPLC en fase reversa C18.	124
Tabla 6. Curvas de calibrado para la cuantificación por HPLC-DAD de los pigmentos cloroplásticos. Límites de detección (LOD), límites de cuantificación (LOQ) y longitud de onda de detección.	124
Tabla 7. Gradiente de elución ternario empleado para el análisis de los pigmentos carotenoides (libres y esterificados) mediante HPLC en fase reversa C30 y espectrometría de masas (HPLC-MS-(APCl)).	126
Tabla 8. Expresión de la velocidad de reacción en función del orden de reacción (n) y parámetros cinéticos derivados.	129
Tabla 9. Relación de cebadores utilizados en la amplificación por qPCR a tiempo real.	132
Tabla 10. Propiedades cromatográficas (HPLC), espectroscópicas (UV-visible y MS) y pruebas químicas de grupos funcionales de los principales carotenoides presentes en extractos directos de tritordeum y trigo duro.	144
Tabla 11. Características cromatográficas y espectroscópicas (UV-visible and MS (APCl+)) de los regioisómeros de ésteres de luteína identificados en granos de tritordeum (HT621).	173
Tabla 12. Composición cualitativa y cuantitativa ($\mu\text{g/g}$) de pigmentos carotenoides presentes en granos de trigo duro y tritordeum*.	178
Tabla 13. Composición relativa (%) entre las formas libres y esterificadas de luteína en tritordeum*.	180
Tabla 14. Análisis de componentes principales (PCA). Valores propios (Eigenvalue), varianza explicada (%), varianza explicada acumulada (%) y valores propios acumulados (Eigenvalue).	183

Tabla 15. Contribución de cada variable a los componentes principales seleccionados (PC1 y PC2).....	184
Tabla 16. Composición de ácidos grasos ($\mu\text{g/g}$)* en granos de trigo duro y tritordeum.	189
Tabla 17. Composición cualitativa y cuantitativa ($\mu\text{g/g}$) de pigmentos carotenoides presentes en granos de <i>Hordeum chilense</i> (reg. PI531781)*	195
Tabla 18. Peso medio de los granos de trigo duro (variedad Simeto) y tritordeum (línea HT621), y distribución porcentual entre embrión y endospermo.....	198
Tabla 19. Composición cualitativa y cuantitativa ($\mu\text{g/g}$) de pigmentos carotenoides presentes en las fracciones de embrión y endospermo de granos de trigo duro (Simeto) y tritordeum (HT621).	200
Tabla 20. Composición relativa (%) entre las formas libres y esterificadas de luteína presentes en el embrión y endospermo de granos de tritordeum (HT621).....	202
Tabla 21. Contribución cuantitativa ($\mu\text{g/g}$) de las fracciones aisladas de endospermo y embrión al perfil de pigmentos carotenoides de granos de trigo duro (Simeto) y tritordeum (HT621).	205
Tabla 22. Valores de la relación entre regioisómeros (ratio 3/3') de luteína monopalmitato y monolinoleato durante el almacenamiento en postcosecha de granos maduros de tritordeum (HT630, HT621 y HT609).	245
Tabla 23. Composición cualitativa y cuantitativa ($\mu\text{g/g}$ *) de pigmentos carotenoides presentes en harinas integrales de trigo duro y tritordeum.....	265
Tabla 24. Constante de velocidad (k ; días^{-1}) y tiempo de vida media ($t_{1/2}$; días) para el contenido total carotenoide en harinas integrales de trigo duro y tritordeum almacenadas a diferentes temperaturas según el modelo cinético de primer orden ($C=C_0-\exp(kt)$).	271
Tabla 25. Composición cualitativa y cuantitativa ($\mu\text{g/g}$)* de pigmentos carotenoides presentes en granos de tritordeum y trigo duro sometidas a almacenamiento prolongado en condiciones de temperatura controlada.....	309
Tabla 26. Composición relativa (%)* de las formas libres y esterificadas de luteína en granos de tritordeum y trigo duro al inicio del almacenamiento prolongado (12 meses).	310
Tabla 27. Composición relativa (%)* de las fracciones monoesterificadas de luteína y sus correspondientes regioisómeros indicando el ratio de los mismos, así como la de diésteres, en granos de tritordeum y trigo duro al inicio del almacenamiento durante doce meses.	310
Tabla 28. Ajuste de un modelo cinético de orden cero ($C-C_0=-kt$) a la evolución del contenido pigmentos libres (no esterificados) presentes en granos de tritordeum	

y trigo duro sometidos a almacenamiento prolongado en condiciones de temperatura controlada.	311
Tabla 29. Ajuste a un modelo cinético de orden cero ($C-C_0=-kt$) a la evolución del contenido de pigmentos totales (incluyendo xantofilas esterificadas) presentes en granos de tritordeum y trigo duro sometidos a almacenamiento prolongado en condiciones de temperatura controlada.	312
Tabla 30. Ajuste de un modelo cinético de primer orden ($\ln(C/C_0)=-kt$) a la evolución del contenido pigmentos libres (no esterificados) presentes en granos de tritordeum y trigo duro sometidos a almacenamiento prolongado en condiciones de temperatura controlada.	313
Tabla 31. Ajuste de un modelo cinético de primer orden ($\ln(C/C_0)=-kt$) a la evolución del contenido de pigmentos totales (incluyendo xantofilas esterificadas) presentes en granos de tritordeum y trigo duro sometidos a almacenamiento prolongado en condiciones de temperatura controlada.	314
Tabla 32. Constantes de velocidad y coeficientes de correlación para un modelo cinético de primer orden en pigmentos esterificados en granos de tritordeum y trigo duro sometidos a almacenamiento prolongado.	315
Tabla 33. Composición cualitativa y cuantitativa ($\mu\text{g/g}$)* de pigmentos carotenoides presentes en harinas de tritordeum y trigo duro sometidas a almacenamiento prolongado en condiciones de temperatura controlada.	347
Tabla 34. Resumen de los fenómenos sintéticos y degradativos para las fracciones de monoésteres y sus respectivos regioisómeros presentes en harinas de trigo duro sometidas a almacenamiento prolongado en condiciones de temperatura controlada.	348
Tabla 35. Ajuste a un modelo cinético de orden cero ($C-C_0=-kt$) de la evolución del contenido pigmentos libres (no esterificados) presentes en harinas de tritordeum y trigo duro sometidas a almacenamiento prolongado en condiciones de temperatura controlada.	349
Tabla 36. Ajuste a un modelo cinético de orden cero ($C-C_0=-kt$) de la evolución del contenido de pigmentos totales (incluyendo xantofilas esterificadas) presentes en harinas de tritordeum y trigo duro sometidas a almacenamiento prolongado en condiciones de temperatura controlada.	350
Tabla 37. Ajuste a un modelo cinético de primer orden ($\ln(C/C_0)=-kt$) de la evolución del contenido pigmentos libres (no esterificados) presentes en harinas de tritordeum y trigo duro sometidas a almacenamiento prolongado en condiciones de temperatura controlada.	351
Tabla 38. Ajuste a un modelo cinético de primer orden ($\ln(C/C_0)=-kt$) de la evolución del contenido de pigmentos totales (incluyendo xantofilas esterificadas) presentes en harinas de tritordeum y trigo duro sometidas a almacenamiento prolongado en condiciones de temperatura controlada.	352

Tabla 39. Constantes de velocidad y coeficientes de correlación para un modelo cinético de primer orden en pigmentos esterificados en harinas de tritordeum y trigo duro sometidos a almacenamiento prolongado.....	353
--	-----

ANEXO

Tabla A1. Evolución del peso del grano (mg) ¹ durante el periodo de desarrollo y maduración en líneas avanzadas de tritordeum y variedades de trigo duro.	363
Tabla A2. Evolución del contenido en agua (% humedad) ¹ del grano durante el periodo de desarrollo y maduración en líneas avanzadas de tritordeum y variedades de trigo duro.	364
Tabla A3. Evolución del contenido de pigmentos individuales (μg/grano PS) ¹ durante el desarrollo y maduración del grano de trigo duro (variedad Don Pedro).	365
Tabla A4. Evolución del contenido de pigmentos individuales (μg/grano PS) ¹ durante el desarrollo y maduración del grano de trigo duro (variedad Simeto).	366
Tabla A5. Evolución del contenido de pigmentos individuales (μg/grano PS) ¹ durante el desarrollo y maduración del grano de trigo duro (variedad Claudio).	367
Tabla A6. Evolución del contenido de pigmentos individuales (μg/grano PS) ¹ durante el desarrollo y maduración del grano de trigo duro (variedad Kofa).	368
Tabla A7. Evolución del contenido de pigmentos individuales (μg/grano PS) ¹ durante el desarrollo y maduración del grano de trigo duro (variedad UC1113).	369
Tabla A8. Evolución del contenido de pigmentos individuales (μg/grano PS) ¹ durante el desarrollo y maduración del grano de tritordeum (variedad HT621).	370
Tabla A9. Evolución del contenido de pigmentos individuales (μg/grano PS) ¹ durante el desarrollo y maduración del grano de tritordeum (variedad HT630).	371
Tabla A10. Evolución del contenido de pigmentos individuales (μg/grano PS) ¹ durante el desarrollo y maduración del grano de tritordeum (variedad HT609).	372
Tabla A11. Evolución del contenido de pigmentos individuales (μg/grano PS) ¹ durante el desarrollo y maduración del grano de tritordeum (variedad HT240).	373
Tabla A12. Evolución del contenido de pigmentos individuales (μg/grano PS) ¹ durante el desarrollo y maduración del grano de tritordeum (variedad HT335).	374
Tabla A13. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides totales (μg/g PF) ¹ durante el almacenamiento en postrecolección de granos maduros de tritordeum y trigo duro.	375

Tabla A14. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides individuales ($\mu\text{g/g}$ PF) ¹ durante el almacenamiento en postrecolección de granos maduros de trigo duro (variedad Don Pedro).	376
Tabla A15. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides individuales ($\mu\text{g/g}$ PF) ¹ durante el almacenamiento en postrecolección de granos maduros de trigo duro (variedad Simeto).	377
Tabla A16. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides individuales ($\mu\text{g/g}$ PF) ¹ durante el almacenamiento en postrecolección de granos maduros de trigo duro (variedad Claudio).	378
Tabla A17. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides individuales ($\mu\text{g/g}$ PF) ¹ durante el almacenamiento en postrecolección de granos maduros de tritordeum (variedad HT630).	379
Tabla A18. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides individuales ($\mu\text{g/g}$ PF) ¹ durante el almacenamiento en postrecolección de granos maduros de tritordeum (variedad HT609).	380
Tabla A19. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides individuales ($\mu\text{g/g}$ PF) ¹ durante el almacenamiento en postrecolección de granos maduros de tritordeum (variedad HT621).	381
Tabla A20. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides totales ($\mu\text{g/g}$ PF) ¹ durante el almacenamiento corto (3 meses) de harinas integrales preparadas con granos maduros de tritordeum y trigo duro.	382
Tabla A21. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides individuales ($\mu\text{g/g}$ PF) ¹ durante el almacenamiento corto (3 meses) de harinas integrales preparadas con granos maduros de trigo duro (variedad Don Pedro).	383
Tabla A22. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides individuales ($\mu\text{g/g}$ PF) ¹ durante el almacenamiento corto (3 meses) de harinas integrales preparadas con granos maduros de trigo duro (variedad Simeto).	384
Tabla A23. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides individuales ($\mu\text{g/g}$ PF) ¹ durante el almacenamiento corto (3 meses) de harinas integrales preparadas con granos maduros de trigo duro (variedad Claudio).	385
Tabla A24. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides individuales ($\mu\text{g/g}$ PF) ¹ durante el almacenamiento corto (3 meses) de harinas integrales preparadas con granos maduros de tritordeum (variedad HT630).	386
Tabla A25. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides individuales ($\mu\text{g/g}$ PF) ¹ durante el almacenamiento corto (3 meses) de harinas integrales preparadas con granos maduros de tritordeum (variedad HT609).	388
Tabla A26. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides individuales ($\mu\text{g/g}$ PF) ¹ durante el almacenamiento corto (3 meses) de harinas integrales preparadas con granos maduros de tritordeum (variedad HT621).	390

Tabla A27. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides totales ($\mu\text{g/g}$ PF) ¹ durante el almacenamiento prolongado (12 meses) de granos maduros de tritordeum (variedad HT621) y trigo duro (variedad Don Pedro).....	392
Tabla A28. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides individuales ($\mu\text{g/g}$ PF) ¹ durante el almacenamiento prolongado (12 meses) de granos maduros de trigo duro (variedad Don Pedro).....	393
Tabla A29. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides individuales ($\mu\text{g/g}$ PF) ¹ durante el almacenamiento prolongado (12 meses) de granos maduros de tritordeum (variedad HT621).....	396
Tabla A30. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides totales ($\mu\text{g/g}$ PF) ¹ durante el almacenamiento prolongado (12 meses) de harinas integrales de tritordeum (variedad HT621) y trigo duro (variedad Don Pedro).....	399
Tabla A31. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides individuales ($\mu\text{g/g}$ PF) ¹ durante el almacenamiento prolongado (12 meses) de harina integral de trigo duro (variedad Don Pedro).....	400
Tabla A32. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides individuales ($\mu\text{g/g}$ PF) ¹ durante el almacenamiento prolongado (12 meses) de harina integral de tritordeum (variedad HT621).....	403

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AACC: American Association of Cereal Chemists.
AMD: Degeneración macular asociada a la edad.
APcl: Ionización química a presión atmosférica.
BCH: β -hidrolasas monooxigenasas dihierro.
BHT: Butilhidroxitolueno.
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.
CC: Cromatografía en columna (Column Chromatographic).
CCDs: Dioxigenasas de carotenoides.
CCS: Capsanteno-capsorrubeno sintasa.
cDNA: ADN complementario (Complementary Deoxyribonucleic acid).
CGIAR: Consultive Group on International Agricultural research.
CIE: Comisión Internacional de l'Éclairage.
CIMMYT: Centro Internacional de Mejora del Maíz y del Trigo.
CPVO: European Community Plant Variety Registration.
CRTI: Fitoeno desaturasa bacteriana.
CRTISO: Caroteno isomerasa.
CYP: Citocromo P450 (Cytochrome P450).
DAD: Detector de array de diodos.
DDA: Días después de antesis.
DE: Xantofilas diesterificadas.
DMAPP: Dimetilalilpirofosfato.
DMP: Dimetoxipropano.
DNA: Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid).
DW: Trigo duro.
DXP: 1-deoxy-D-xilulosa-5-fosfato.
DXR: 1-deoxi-D-xiloloxa-5 fosfato reductasa.
DXS: 1-deoxy-D-xilulosa-5-fosfato sintasa.
E1: Estadio de desarrollo 1 (8 DDA).
E2: Estadio de desarrollo 2 (14 DDA).
E3: Estadio de desarrollo 3 (18 DDA).
E4: Estadio de desarrollo 4 (25 DDA).
ECH: ϵ -hidrolasas.
EF: Estadio final.
EPL: Éter de petróleo ligero.

ER: Equivalente de retinol.

ESI: Ionización por electrospray (Electrospray ionization).

FAD: Flavina adenina dinucleótido.

FAMES: Ésteres metílicos de ácidos grasos (Fatty acid methyl esters).

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

FID: Detector de ionización de llama.

FM: Marcadores funcionales (Functional Markers).

GB: Gigas de Bases.

GC: Cromatografía de gases (Gas Chromatography).

GGPP: Geranilgeranilpirofosfato.

GGPS: Geranilgeranil difosfato sintasa.

H^{ch}: *Hordeum chilense*.

HDLs: Lipoproteínas de alta densidad (High density lipoproteins).

HDR: Hidroximetilbutenil difosfato reductasa.

HMBPP: 4-hidroxí-3-metilbut-2-enil difosfato.

HMW: Subunidades de elevado peso molecular.

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography).

HT: Tritordeum.

ICC: International Association for Cereal Science and Technology.

IDI: Isopentenil difosfato isomerasa.

IPP: Isopentenil difosfato.

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (International Union of Pure and Applied Chemistry).

LDLs: Lipoproteínas de baja densidad (Low density lipoproteins).

LOD: Límite de detección (Limit Of Detection).

LOQ: Límite de cuantificación (Limit Of Quantitation).

MAS: Selección asistida por marcador (Marker Assisted Selection).

MBC: Clonación basada en mapa (Map-based cloning).

ME: Xantofilas monoesterificadas.

MEP: Metil-eritritol-pirofosfato.

MS: Espectrometría de masas (Mass Spectrometry).

MTBE: Metil-tert-butil éter.

MVA: Ácido mevalónico.

NADP: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

NCBI: National Center for Biotechnology Information.

NCED: 9-*cis*-epoxicarotenoide-dioxigenasa.

NIRS: Espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (Near-Infrared Spectroscopy).

NSGC: National Small Grains Collection.

NXS: Neoxanteno sintasa.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PCA: Análisis de Componentes Principales.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PCs: Componentes Principales.

PDS: Fitoeno desaturasa.

PS: Fotosistemas (Photosystems)

PSY: Fitoeno sintasa (Phytoene synthase).

QTL: Locus de rasgo cuantitativo (Quantitative Trait Loci).

RAPDs: ADN polimórfico amplificado al azar.

R_f: Factor de retención.

RFLPs: Polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción.

RNA: Ácido ribonucleico (Ribonucleic acid).

RNAi: Interferencia por ARN (RNA interference).

ROS: Especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species).

R_t: Tiempo de retención.

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real.

SCARs: Amplificación de regiones de secuencia caracterizada.

SDG: Set Domain Group.

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

SNP: Polimorfismo de nucleótido simple (single-nucleotide polymorphism).

SSRs: Repeticiones simples de secuencia o secuencia de repetición única (simple sequence repeat).

STs: Secuencias indicadoras de un sitio específico.

t_{1/2}: Tiempo de vida media.

THF: Tetrahidrofurano.

TILLING: Targeting Induced Local Lesions in Genomes.

TLC: Cromatografía en capa fina (Thin Layer Chromatography).

T_m: Temperatura de hibridación.

UHPLC: Cromatografía Líquida de Ultra-alta Presión (Ultra High Performance Liquid Chromatography).

UMA: Unidad de Masa Atómica.

UNICEF: Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (United Nations Children's Fund).

USDA: Departamento de Agricultura de Estados Unidos (US Department of Agriculture).

VDE: Violaxanteno de-epoxidasa.

VLDLs: Lipoproteínas de muy baja densidad (very low density lipoproteins).

XAT: Xanthophyll Acyl Transferase.

YPC: Yellow pigment content.

ZDS: ζ -Caroteno desaturasa.

ZEP: Zeaxanteno epoxidasa.

ZISO: ζ -Caroteno isomerasa.

β LCY: Licopeno β -ciclasa.

ϵ LCY: Licopeno ϵ -ciclasa.



1. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos cincuenta años, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), se han centrado en estimar la población mundial que sufre hambre o la llamada malnutrición proteicoenergética. Sin embargo, en la última década, la malnutrición debida a deficiencias en micronutrientes ha sido identificada como la principal causa de los numerosos problemas de salud existentes en los países subdesarrollados (Graham *et al.*, 1999; Toenniessen, 2002). En estas zonas geográficas la fortificación de alimentos procesados, algo que en países desarrollados es una práctica habitual, no resulta ser una buena alternativa para combatir dichas carencias nutricionales. El limitado desarrollo de la industria alimentaria e infraestructuras de estos países serían las principales causas (Pfeiffer y McClafferty, 2007). Debido a ello, los estudios sobre el papel de los micronutrientes y de los compuestos funcionales en la salud humana, así como el potencial existente en los cultivos como factorías de los mismos ha experimentado un creciente interés entre la comunidad científica. Aunque todavía persisten las causas subyacentes a la mayoría de los problemas de nutrición (pobreza, ignorancia, enfermedad, inadecuado suministro de alimentos, ambientes insalubres, estrés social, etc.), el enfoque para tratar la malnutrición ha cambiado sustancialmente (Bouis *et al.*, 2011). La relación entre dieta y salud, así como la biofortificación de cultivos son áreas activas de investigación (Welch y Graham, 2004; Hirschi, 2009).

Los vegetales son considerados como la fuente primaria de micronutrientes, tanto minerales como orgánicos, y durante las últimas décadas los esfuerzos para la mejora de los alimentos de origen vegetal han sido intensos, en especial en lo relativo a la mejora de las características agronómicas y a la optimización del contenido en micronutrientes. El consumo de frutos y vegetales frescos ha cobrado especial importancia, existiendo numerosos estudios al respecto, siendo referentes de un estado de vida saludable en los países desarrollados. Alimentos vegetales básicos, entre los que se encuentran los cereales y los tubérculos pueden tener un gran impacto para poblaciones de bajos recursos, cuya dieta se fundamenta principalmente en alimentos de bajo coste. Esto convierte a estos alimentos, y en especial a los cereales, en alimentos ideales para ser utilizados en estrategias de biofortificación (Bai *et al.*, 2011). El trigo no solo representa una fuente importante de hidratos de carbono, y en menor medida de proteínas, sino que además contiene minerales, vitaminas y antioxidantes. Dentro de estos últimos se encuentran los pigmentos carotenoides.

Los pigmentos carotenoides, son moléculas de naturaleza lipofílica, responsables de las coloraciones amarilla, naranja y roja que presentan la mayoría de frutos y ciertos animales (Britton y Hornero-Méndez, 1997). Estos últimos no son capaces de sintetizarlos, por lo que deben adquirirlos a través de la dieta. Los carotenoides desempeñan en los vegetales su función básica como pigmentos colectores de luz en el aparato fotosintético, evitando el daño oxidativo, y participando finalmente de forma activa como antioxidantes en toda la planta. Fruto de la propiedad antioxidante, e independientemente de la actividad provitamina A que presentan algunos como β -caroteno, se derivan funciones importantes para la salud humana, como es la prevención de ciertas enfermedades degenerativas, cáncer u otras dolencias relacionadas con el estrés oxidativo. Aunque los cereales presentan un contenido en carotenoides relativamente bajo, comparado con la mayoría de frutos y vegetales, el consumo diario de cereales y productos derivados por la mayoría de la población, los convierte en una fuente no despreciable de estos compuestos (Graham y Rosser, 2000). La mayoría de las variedades de cereales presenta como pigmento principal luteína y cantidades menores de zeaxanteno. Ambos pigmentos están cobrando especial atención por su distribución específica en el tejido macular humano y su papel en la prevención de enfermedades oculares (Bone *et al.*, 2000; Landrum y Bone, 2001), siendo posible modular los niveles de éstos a través de su incorporación a partir de alimentos o de suplementos nutrifarmacéuticos (Schalch *et al.*, 2007).

En el proceso de biofortificación en carotenoides de los cultivos, ya sea mediada por mejora vegetal clásica o asistida por ingeniería genética, un paso imprescindible es la caracterización exhaustiva del perfil carotenoide existente en el vegetal. Este conocimiento facilita la exploración del metabolismo de los mismos, siendo este aspecto finalmente lo que se persigue. Los estudios dirigidos a mejorar la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de carotenoides en cereales se beneficiarán, sin duda, del conocimiento así generado, facilitando la orientación y recomendaciones al consumidor sobre la adecuación de los hábitos de procesado y consumo de los alimentos básicos. Hasta la fecha, existen numerosos datos sobre composición cualitativa y cuantitativa de carotenoides en frutos y vegetales, pero muy pocos con respecto a los cereales, siendo necesario realizar estudios que permitan la caracterización de dicho perfil carotenoide en este tipo de alimentos.

El perfil, tanto cualitativo como cuantitativo, de pigmentos carotenoides presentes en los alimentos se modifica durante el almacenamiento y procesado, doméstico o industrial, de los mismos. La evaluación de dichos cambios es un área habitual de estudio en tecnología de alimentos, posibilitando estimar las condiciones óptimas para la preservación de estos fitoquímicos, impulsado tanto por sus propiedades nutricionales como por las aplicaciones derivadas de su naturaleza como responsables del color de los alimentos.

Estudios comparativos entre variedades de cereales ampliamente comercializadas y cereales mejorados, nuevos en el mercado, como tritordeum pueden resultar de interés desde ambos puntos de vista, proporcionando datos sobre la viabilidad y repercusión de la biofortificación en carotenoides de cereales. Los tratamientos térmicos y los que imprimen una homogenización a la matriz alimentaria sí como la composición de ésta son factores conocidos por implicar un efecto potenciador de la bioaccesibilidad de los carotenoides, ya que se facilita la solubilización de éstos. En este contexto, alimentos como los cereales, que habitualmente se consumen procesados y no frescos, podrían presentar ventajas a tener en cuenta.

De manera análoga al procesado, otro factor desencadenante de los niveles desiguales de carotenoides presentes en cereales constituye la selección ejercida sobre éstos por el hombre. La comparación de los niveles de pigmentos entre trigo duro y harinero así lo indica. Éste último, fruto de una selección sistemática hacia harinas más blancas, ha ido perdiendo en gran medida el aporte en carotenoides original. En este sentido esta carencia podría revertirse por el consumo de cereales como tritordeum y sus derivados, pan y productos afines.

Por todo ello, el estudio del metabolismo y estabilidad de los pigmentos carotenoides en los cereales, junto con la obtención de cereales con un mayor contenido, y el establecimiento de las condiciones óptimas de almacenamiento son áreas de investigación que deben ser exploradas para erradicar la malnutrición que aún persiste en zonas empobrecidas del mundo.

2. ANTECEDENTES.



“Los cereales constituyen la fuente de nutrientes más importante de la humanidad. Históricamente están asociados al origen de la civilización y cultura de todos los pueblos. El hombre pudo pasar de nómada a sedentario cuando aprendió a cultivar los cereales y obtener de ellos una parte importante de su sustento. Cada cultura, cada civilización, cada zona geográfica del planeta, produce y consume unos tipos de cereales específicos creando toda una cultura gastronómica y de otros usos en torno a ellos.”

2.1. Los cereales

2.1.1. El trigo y resto de cereales. Alimentos básicos de la humanidad.

El término *Cereal* deriva de *Ceres*, nombre latino para la diosa griega del pan y de la agricultura, *Deméter*. Los cereales han jugado un papel muy importante en la historia de las civilizaciones, constituyendo la base de la alimentación para la población mundial. Es por ello que han sido, y son, objeto de numerosas investigaciones y publicaciones. A continuación se describen los cereales más ampliamente utilizados por la humanidad (Figura 1), así como los usos que de éstos se hace.

El término *Trigo* es empleado para designar al conjunto de cereales, tanto cultivados como silvestres, que conforman el género *Triticum*. Son plantas anuales de la familia de las gramíneas (*Poaceae*), ampliamente cultivadas en todo el mundo. La palabra *trigo* proviene del vocablo latino *triticum*, que significa ‘quebrado’, ‘triturado’ o ‘trillado’, haciendo referencia a la manipulación que se debe realizar para separar el grano de trigo de la cascarilla que lo recubre. *Triticum* significa, por lo tanto, el grano que es necesario trillar para poder ser consumido (Pallarés *et al.*, 2007). El trigo es, junto al maíz y el arroz, uno de los tres cereales más ampliamente producidos globalmente, y desde la antigüedad el más consumido en occidente. El grano de trigo es utilizado para hacer harina, sémola y malta, así como una gran variedad de productos alimenticios derivados de estos, como pan, galletas, cerveza, whisky, pasta, cereales de desayuno, aperitivos, etc. (Mergoum *et al.*, 2009). El trigo se cultiva preferentemente para ser destinado al consumo humano, y en menor proporción para piensos de animales. En Europa el trigo constituyó la principal fuente de almidón para la fabricación de papel y cartón, hasta que se introdujo en el siglo XV el cultivo del maíz.

El arroz (*Oryza sativa*) es posiblemente el cereal que se cultiva desde hace más tiempo junto con el trigo (10.000 años), ocupando casi el 10% de la superficie dedicada a cultivo. El arroz ha constituido a través de la historia uno de los alimentos más importantes en la dieta humana, y en la actualidad representa la base de la alimentación de dos tercios de la población mundial. No obstante, existe una gran diferencia entre el consumo de éste en los países en vías de desarrollo (104.7 kg/persona y año) y los países desarrollados (16.1 kg/persona y año) (Rosell *et al.*, 2007).

El maíz (*Zea mays*) constituye un cereal ancestral, cuyo origen es todavía objeto de debate (Brites *et al.*, 2007a). Recientemente, se ha propuesto que el maíz actual deriva del teosinte (*Zea mays* sp. *Parviglumis* y Mexicana), una hierba nativa del Valle Central de México, de donde se difundió hacia el norte (Canadá) y hacia el sur (Argentina). Las evidencias más antiguas del maíz datan de hace aproximadamente 7.000 años de antigüedad, y fueron encontradas en el valle de Tehuacán (México). Una gran parte del área mundial sembrada con maíz es cosechada para ser consumido como mazorcas verdes o como alimento animal. El maíz es en la actualidad, el cereal con mayor producción mundial, 884 millones de toneladas en 2011 (FAOSTAT), superando al trigo y al arroz con 704 y 723 millones de toneladas, respectivamente.

La cebada (*Hordeum vulgare*) constituye otro de los cereales más ampliamente producido en el mundo, y al igual que el arroz y el trigo, uno de los primeros cultivos domesticados por el hombre. Se trata del cuarto cereal en la producción mundial detrás del maíz, el trigo y el arroz (FAOSTAT). El principal uso de este cultivo es la alimentación animal, tanto la semilla como la planta; mientras que para el consumo humano su principal destino es la producción de la malta para la elaboración de cerveza y whisky (Horsley *et al.*, 2009).

El centeno (*Secale cereale*) es un cereal cuyo origen, al igual que para el trigo y cebada, se sitúa en el sudoeste asiático. Aunque la producción del centeno está distribuida por todo el mundo, ésta se concentra especialmente en Europa (89% de la producción mundial), alcanzando valores cercanos a las 15-18 millones de toneladas anuales. Una gran parte de la producción se destina a ensilaje y forraje para la alimentación animal, y el resto a la elaboración de pan (Brites *et al.*, 2007b).



Figura 1. Principales cereales domesticados y utilizados en agricultura. Trigo (*Triticum* spp.) (A), Arroz (*Oryza sativa*) (B), Maíz (*Zea mays*) (C), Cebada (*Hordeum vulgare*) (D), Centeno (*Secale cereale*) (E), Triticale (x *Triticosecale* Wittmack) (F).

Un cereal interesante, y que debe ser mencionado en este apartado, es el denominado Triticale (x *Triticosecale* Wittmack), originado como el híbrido resultante entre el trigo y el centeno. Los primeros híbridos se obtuvieron en 1876, pero no se produjeron híbridos fértiles hasta aproximadamente un siglo después (Martín *et al.*, 1999; Feuillet *et al.*, 2007). Con la aparición por tanto de los primeros híbridos fértiles, este cereal pasó de una mera curiosidad biológica a un cultivo comercial. Actualmente la producción mundial de triticale está en permanente aumento, superando los 13 millones de toneladas en 2011 (FAOSTAT). Al igual que el centeno, gran parte de la producción de triticale se destina a la alimentación animal (Brites *et al.*, 2007b).

Existen otros cereales de menor importancia (**Figura 2**), como la avena (*Avena sativa*), sorgo (*Sorghum bicolor*) y mijo (*Panicum miliaceum*). Estos cereales ocupan a nivel mundial el 13,9% de la superficie de cultivo (6.7%, 5.4% y 1.8%, respectivamente), alcanzando el 5.3% de la producción total (2.7%, 1.4% y 1.2%, respectivamente). Sorgo y mijo han sido, desde la antigüedad, alimentos básicos en zonas tropicales semiáridas de Asia y África. En la actualidad forman parte de alimentos y bebidas no tradicionales y novedosas (gachas instantáneas, bebidas malteadas y cervezas), y su utilización creciente como grano entero en la fabricación de productos saludables proporciona valor añadido a estos cereales menores. Al tratarse de cereales libres de gluten se están utilizando

ampliamente en formulaciones de alimentos destinados a personas celiacas. Con respecto a la avena, en un principio fue un cereal poco aceptado, pero recientemente ha experimentado un creciente interés por sus propiedades nutricionales y saludables (Collar, 2007).



Figura 2. Cereales de menor importancia en cuanto a su producción. Avena (*Avena sativa*) (A), sorgo (*Sorghum bicolor*) (B) y mijo (*Panicum miliaceum*) (C).

Por último, y no por ello menos importante, en esta introducción general debemos destacar un último y novedoso cereal, y que es objeto de estudio en la presente tesis, *Tritordeum*, (Figura 3). Se trata de un cereal obtenido a través del cruce entre una cebada silvestre (*Hordeum chilense*) de genoma diploide ($H^{ch}H^{ch}$), y trigos diploides y poliploides (Martín y Chapman, 1977). Los primeros híbridos fértiles, y con características óptimas para convertirse en un posible cultivo, no se obtuvieron hasta los cruces de *H. chilense* con *T. turgidum* (trigo duro, tetraploide, de dotación genómica AABB), produciéndose así los denominados *Tritordeum hexaploides* ($2n=6x=42$, $H^{ch}H^{ch}AABB$) los cuales mostraban una baja frecuencia de aneuploides, una amplia variación en la tasa de crecimiento y un grado óptimo de fertilidad (Martín y Sánchez-Monge Laguna, 1982). Actualmente tritordeum está siendo sometido a un intenso programa de mejora desarrollado en el Instituto de Agricultura Sostenible (CSIC) en Córdoba, para optimizar su uso como un nuevo cereal y su incorporación a la formulación de alimentos funcionales. Sus zonas de cultivo se concentran en España (Andalucía, Castilla y Cataluña), sur de Italia y sur de Portugal. En 2008 fue registrada, con el nombre Aucán, la primera línea de tritordeum en el *European Community Plant Variety Registration* (CPVO), estando otras líneas avanzadas en sus últimas fases de desarrollo y evaluación. Como resultado de estos esfuerzos, a principios de 2013, la empresa española Agrasys (www.agrasys.es) ha comenzado la comercialización de harinas de tritordeum bajo la marca Vivagran®.



Figura 3. Espiga de tritordeum (*H. chilense* x *T. turgidum* conv. *Durum*). (Fotografía: Antonio Martín).

2.1.1.1. Historia, origen y filogenética.

El trigo tiene sus orígenes en la antigua Mesopotamia (**Figura 4**) actualmente comprendiendo la zona de Oriente Próximo. Las primeras evidencias paleoarqueológicas localizan el cultivo del trigo en Siria, Jordania, Turquía e Iraq. Existen hallazgos de granos de trigo almidonero (*Triticum dicoccoides*) y huellas de granos en barro cocido en Jarmo (Iraq septentrional), datados en torno al año 6.700 a.C. Hace unos 10.000 años, el trigo silvestre experimentó una serie de eventos de hibridación natural, dando como resultado una planta con semillas más grandes y difícilmente diseminadas por el viento. El éxito de este vegetal en estado salvaje habría sido limitado, siendo la domesticación por iniciativa de los seres humanos como fuente de alimento la que posibilitó el mismo provocando una auténtica revolución agrícola en el denominado *Creciente Fértil* (región histórica que abarcaba parte de los territorios del Antiguo Egipto, el Levante mediterráneo y Mesopotamia). El asentamiento de las poblaciones humanas en torno a la Agricultura, condujo a la domesticación de algunos animales, como la oveja y la cabra, y con ello la formación de comunidades humanas más complejas. La agricultura y la ganadería nacientes exigían un cuidado continuo, lo que generó una conciencia acerca del tiempo y las estaciones, obligando a estas pequeñas sociedades a guardar provisiones para las épocas menos generosas, y la simiente para el siguiente año. La posibilidad de poder almacenar los granos de trigo durante largas temporadas impulsó su uso agrícola como fuente de alimento (Feuillet *et al.*, 2007). Las semillas de trigo fueron inicialmente cultivadas

en el valle del Nilo por la civilización del antiguo Egipto, y de allí pasó a las civilizaciones griega y romana.

La molienda del trigo y otros cereales, es decir, la transformación del grano en harina, es un proceso más antiguo que la propia agricultura y supone una parte importante de su historia. Los primeros humanos recolectaban los granos de trigo, y otros cereales, y los trituraban con piedras que hacían las veces de morteros. Posteriormente, en Grecia (500 a.C.), se mejoró el sistema con el desarrollo de la piedras de moler o molinos, consistentes en dispositivos en los que dos piedras planas superpuestas giraban una sobre la otra triturando los granos que se colocaban entre las mismas. Desde entonces, se ha aprovechado el movimiento circular para hacer más eficiente la molienda de los cereales, utilizando la fuerza motriz generada por animales, personas, agua, viento, vapor y más modernamente la electricidad (Pallarés *et al.*, 2007). La **Figura 5** muestra algunos de los dispositivos de molienda anteriormente mencionados.



Figura 4. La domesticación de los cereales. La zona verde sobre el mapa muestra la región del Oriente Próximo (Israel, Jordania, Turquía, Siria, Irán e Iraq), conocido como el Creciente Fértil donde se encontraron los primeros hallazgos arqueológicos del cultivo del trigo (Feuillet *et al.*, 2007).

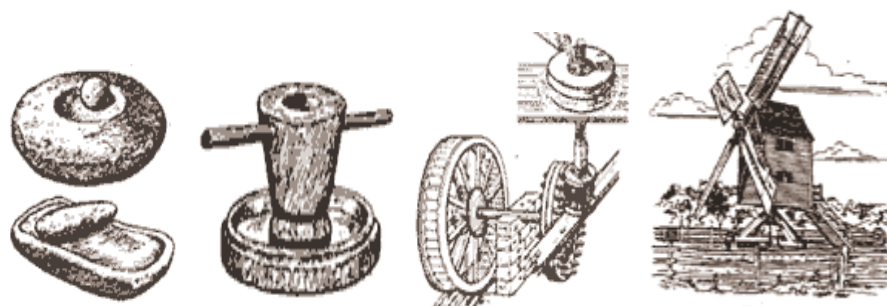


Figura 5. Utensilios y dispositivos usados para moler las semillas de cereales a lo largo de la historia.

Los procesos a través de los cuales las plantas silvestres han evolucionado hasta convertirse en domesticadas pueden ser clasificados en tres categorías principales: variación mendeliana, hibridación interespecífica y la poliploidía. Un ejemplo clásico es el caso del trigo, cuya domesticación se realizó en base a dos criterios; la selección de plantas que mostraban un menor grado de fragilidad de las espigas y la de aquellas que tenían un mayor tamaño de grano. Además, hubo un tercer carácter de selección menos evidente, que fue el utilizar aquellas plantas en las que el grano pudiera ser fácilmente separado de las glumas de modo que apareciera desnudo, tal y como nos lo encontramos en las especies actuales. Recientes estudios han mostrado que la alopoliploidía aceleró la evolución genómica del trigo de dos maneras, por un lado desencadenó cambios rápidos en el genoma a través de la generación de una serie de alteraciones epigenéticas y genéticas importantes, y por otro lado facilitó cambios genómicos esporádicos durante la vida de las especies, algo que no es alcanzable a nivel de diploidía. Sin embargo, este efecto se ha visto continuamente contrarrestado por la presión ejercida por el hombre mediante la domesticación, de modo que la evolución del trigo se ha caracterizado por una acumulación de divergencias de secuencias en las especies diploides seguida por convergencia vía alopoliploide (Golovkina *et al.*, 2007). El trigo, por tanto, es producto de una serie de procesos de hibridación natural junto con una duplicación de cromosomas.

Desde el punto de vista filogenético, las especies de trigo constituyen una serie clásica de poliploides que tienen como base una dotación de siete cromosomas (Akhunov *et al.*, 2005). En 1753, Carl von Linné propuso una primera clasificación de los trigos basándose en diferencias fisiológicas y morfológicas. Posteriormente, y como resultado de los trabajos en citogenética de Sakamura en 1918, apareció una nueva clasificación que atendía al número de cromosomas presentes en cada tipo morfológico previamente reconocido. Después de este descubrimiento básico, un gran número de botánicos y genéticos propusieron sus propias clasificaciones. Actualmente la más aceptada es la clasificación de Mac Key (Mac Key, 1988), debido a que es una de las que más respeta las

reglas de la nomenclatura botánica y la única que otorga igual importancia a los criterios morfológicos, fisiológicos, citológicos, genéticos, bioquímicos y evolutivos. El esquema adjunto muestra la clasificación del género *Triticum* propuesta por Mac Key en 1988.

Género *Triticum* L. (Clasificación propuesta por Mac Key, 1988).

Section Monococca Flaksb.

Triticum monococcum L.

subsp. *monococcum*

subsp. *boeoticum* (Boiss.) Á. Löve & D. Löve

var. *aegilopoides* (Link) MacKey

var. *thaoudar* (Reuter in Bourg. ex Hausskn.) Percival

Triticum urartu Tumanian ex Gandilyan

Section Dicoccoidea Flaksb.

Triticum turgidum L.

subsp. *turgidum*

var. *turgidum*

var. *durum* (Desf.) MacKey

var. *turancium* (Jakubz.) MacKey

var. *polonicum* (L.) MacKey

subsp. *carthlicum* (Nevski in Kom.) Á. Löve & D. Löve

subsp. *dicoccum* (Schränk ex Schüller) Thell.

subsp. *georgicum* (Dekapr. & Menabde) MacKey

subsp. *dicoccoides* (Körn. ex Asch. & Graebner) Thell.

Triticum timopheevii (Zhuk.) Zhuk.

subsp. *timopheevii*

subsp. *armeniaceum* (Jakubz.) MacKey

Section Speltoidea Flaksb.

Triticum aestivum L.

subsp. *aestivum*

subsp. *compactum* (Host) MacKey

subsp. *macha* (Dekapr. & Menabde) MacKey

subsp. *spelta* (L.) Thell.

subsp. *sphaerococcum* (Percival) MacKey

Triticum zhukovskyi Menabde & Ericzjan

En la historia evolutiva (**Figura 6**) del trigo cobran especial relevancia las especies: *Triticum urartu* (trigo Einkorn, con dotación genómica AA), *Aegilops speltoides* (pasto silvestre, con genoma SS el cual contribuyó al genoma B del trigo) y *Aegilops tauschii*

(Goatgrass, con dotación genómica DD), ya que son respectivamente las fuentes diploides inmediatas o parientes más cercanos, portadores de los genomas A, B y D de los trigos poliploides (Dvorak *et al.*, 1998; Akhunov *et al.*, 2005). La primera sección en la clasificación del género *Triticum* está constituida por los trigos diploides, que presentan la dotación genómica más simple, genoma AA y 14 cromosomas. Este grupo se considera el más ancestral en la evolución del trigo. Existen dos líneas evolutivas de trigos diploides, portadoras de dos genomas A distintos, distinguiéndose el procedente de *T. urartu* (Tumanian ex Gandilyan, Einkorn wheat), y el genoma A de *Triticum boeoticum* (Boiss.), el cual se ha propuesto como el ancestro del genoma A de *Triticum monococcum* L. (Golovnina *et al.*, 2007).

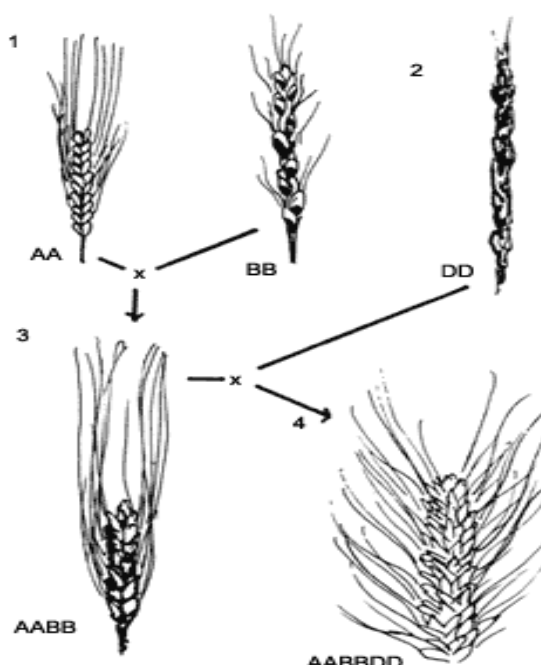


Figura 6. Evolución durante la domesticación del trigo (Mangelsdorf, 1953). 1. Trigo Einkorn, diploide con 14 cromosomas; 2. Pastos silvestres del género *Aegilops*; 3. Trigo Emmer, duro tetraploide con 28 cromosomas. 4. Trigo comúnmente usado para elaborar pan, hexaploide con 42 cromosomas.

Los trigos alotetraploides comprenden un conjunto de especies de dotación genética AABB y un total de 28 cromosomas. En este grupo destaca *T. turgidum* L. en el que podemos citar las siguientes subespecies: subsp. *turgidum* (trigo duro), subsp. *carthlicum* (Nevski in Kom.) Á. Löve & D. Löve, subsp. *dicoccum* (Schränk ex Schüller) Thell, subsp. *georgicum* (Dekapr. & Menabde) MacKey, y subsp. *dicoccoides* (Körn. ex Asch. & Graebner) Thell. La diferencia morfológica más notable en este grupo es la presencia y

ausencia de glumas. Se considera que el primer paso en la evolución de los trigos cultivados fue la formación de *T. turgidum* subsp. *dicoccoides* (Schneider *et al.*, 2008). Estos trigos tetraploides proceden de la hibridación de dos especies diploides silvestres, una probablemente cercana a *A. speltooides* Tausch. (genoma BB aunque generalmente es designado por SS) y *T. urartu* tumanian (trigo Einkorn, genoma AA), (Sarkar y Stebbins, 1955; Akhunov *et al.*, 2005; Jauhar, 2006; Petersen *et al.*, 2006). Estas dos especies hibridaron hace aproximadamente medio millón de años y produjeron un híbrido tetraploide ancestral al que se le denomina trigo Emmer (**Figuras 7 y 8**).



Figura 7. Espigas y granos de trigos Einkorn, Emmer y Spelt

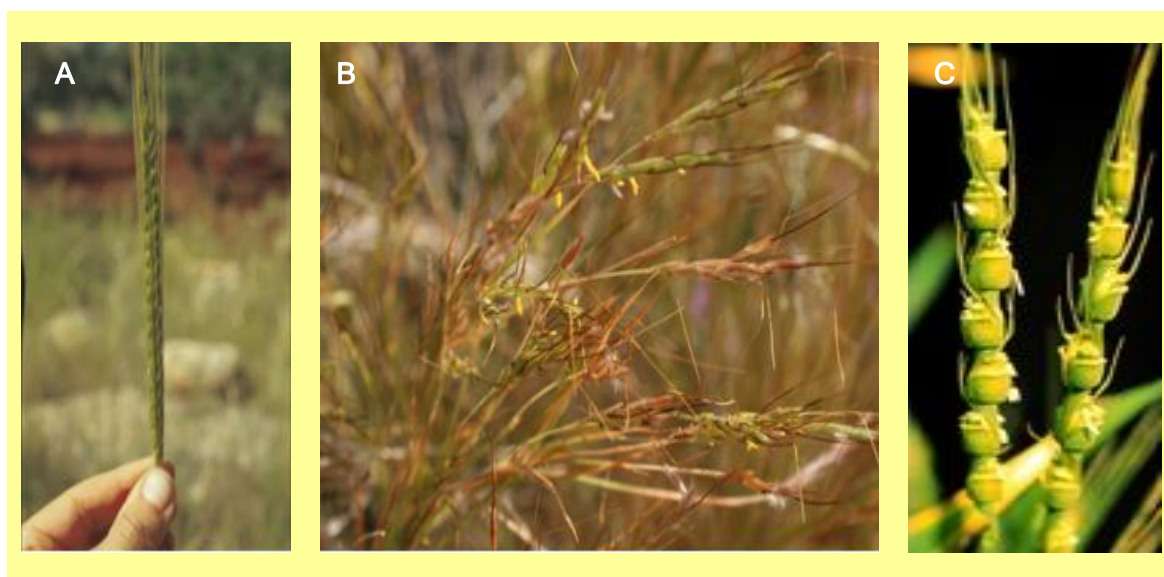


Figura 8. Espigas de *Triticum urartu* L. (A); Espigas de *Aegilops speltooides*. (B); Espigas de *Aegilops tauschii* (C).

El responsable del conjunto génico B sigue siendo dudoso a pesar de los numerosos estudios filogenéticos y el empleo de herramientas genéticas cada vez más precisas y sofisticadas (Sarkar y Stebbins, 1955; Liu *et al.*, 2003a; Provan *et al.*, 2004; Petersen *et al.*, 2006; Golovnina *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007; Schneider *et al.*, 2008). Actualmente la hipótesis más aceptada considera el origen del genoma B del trigo de naturaleza polifilética, esta teoría está apoyada por estudios moleculares realizados con secuencias de ADN cromosómicas específicas no codificantes de baja copia (Liu *et al.*, 2003a; Golovnina *et al.*, 2007).

T. aestivum da nombre a la serie de trigos alohexaploides de dotación genómica AABBDD y 42 cromosomas. Comprende un número de subespecies, diferenciadas por un reducido grupo de genes principales (Dvorak *et al.*, 1998). Al igual que los trigos tetraploides, existen dos grupos claramente diferenciados, aquellos que presentan glumas (grano cubierto), entre los que se pueden citar las subespecies: subsp. *spelta* (trigo espelta), subsp. *macha*, subsp. *Vavilovii*, y subsp. *Yunnanense*. Mientras que por otro lado, tenemos aquellos que presentan el grano desnudo, libre de trillar, entre los que destaca la subsp. *aestivum* (trigo harinero), subsp. *compactum*, subsp. *sphearococcum* (trigo arrocer), y subsp. *tibetanum* (trigo tibetano). Existen numerosas evidencias genéticas que indican que el origen de estos trigos se debe a eventos de hibridación entre los tetraploides *T. turgidum* subsp. *dicoccoides*, (trigo Emmer, forma domesticada, genoma AABB) y los diploides *A. tauschii* Coss. (genoma DD) (Dvorak *et al.*, 1998; Akhunov *et al.*, 2005; Petersen *et al.*, 2006). Sin embargo, a pesar de los estudios filogenéticos realizados, existe cierta controversia sobre la generación de ambos grupos y el orden de aparición. Así pues, los estudios de McFadden y Sears (1946) concluían que el trigo hexaploide espelta (Spelt) con glumas es ancestral a los trigos de grano desnudo. Por otro lado, una hipótesis alternativa a la de estos autores es que *spelta* fue derivado por hibridación introgresiva entre un trigo hexaploide de grano desnudo y *T. turgidum* subsp. *dicoccum* (Schrank) Thell. de grano cubierto. Entendiéndose por hibridación introgresiva una forma de hibridación interespecífica en la que tras la hibridación entre dos especies siguen retrocruzamientos sucesivos con una de las dos especies parentales. Jaaska (1978) concluía de estudios procedentes de análisis de aloenzimas en el genoma A, que el trigo *spelta* europeo podría haberse originado independientemente del Asiático. Así *spelta* europeo podría realmente haberse originado por hibridación introgresiva de *T. aestivum* con *T. turgidum* ssp. *dicoccum*, mientras que el asiático podría considerarse la forma ancestral de los trigos hexaploides.

Como se indicó anteriormente, *A. tauschii* es el donador del genoma D en los trigos hexaploides. Debido a la posibilidad de recombinación entre tetraploides y hexaploides, los genomas A y B son fuentes menos fiables para estudiar las relaciones entre las formas hexaploides de los trigos, que el genoma D. Además, el hecho de que el genoma D no recombina en tales cruces, puede potencialmente proporcionar información sobre las relaciones en estos trigos y el origen de *spelta* y otras formas de *T. aestivum*. *A. tauschii* presenta dos conjuntos génicos, S y T, estrechamente afiliados con las subespecies *strangulata* y *tauschii* (Dvorak *et al.*, 1998; Akhunov *et al.*, 2005). Se han realizado estudios basados en isoenzimas para identificar la subespecie de *A. tauschii* responsable de la contribución del genoma D a *T. aestivum*, encontrándose que el espectro de alelos del locus de la α -amilasa en *T. aestivum* correspondía mejor al de la subespecie *strangulata* que al de la subespecie *tauschii* (Jaaska, 1980; Jaaska, 1981; Dvorak *et al.*, 1998). Paralelamente se encontró polimorfismo en los locus correspondiente a los genes de la aspartato aminotransferasa y alcohol deshidrogenasa entre las subespecies de *A. tauschii*, y en ambos casos, las isoenzimas de la subespecie *strangulata* tenían la misma movilidad electroforética que las encontradas en *T. aestivum*. Las especies ancestrales del género *Aegilops* han sido explotadas para la mejora del trigo. Su habilidad para adaptarse a distintos ambientes y condiciones desfavorables, han hecho que porten atributos agronómicos deseables para los programas de mejora. De esta forma, caracteres de tolerancia a estrés hídrico y/o salino, resistencia a enfermedades o plagas de insectos, han sido incorporados al genoma del trigo desde esas especies, mediante la generación de híbridos intersepecíficos entre *Triticum* y *Aegilops* (Akhunov *et al.*, 2005; Schneider *et al.*, 2008).

2.1.1.2. Producción y comercio mundial.

De forma generalizada, el comercio mundial de los cereales, viene marcado en los últimos años por un desequilibrio importante entre la oferta y la demanda. Centrándonos en el trigo, éste se cultiva geográficamente en todo el mundo, ocupando el 17% del total de la superficie cultivada, unos 200 millones de hectáreas.

La **Figura 9** muestra la evolución de la producción mundial de trigo durante el periodo 1960-2007, experimentando durante dicho intervalo un aumento del 95.7% (FAOSTAT). El incremento continuado que se observa se debió inicialmente (1950-1980) a la expansión de las zonas de cultivo y al aumento de los rendimientos, aunque desde 1960 el mayor impacto en el crecimiento de la producción del trigo lo tuvo la *Revolución Verde* que supuso la adopción de nuevas tecnologías de producción. Hoy en día, el trigo se cultiva en 115 países, y constituye el cereal dominante en el comercio mundial, siendo los

principales productores China, Estados Unidos e India; una gran extensión de cultivo se localiza también en Rusia, Europa, Canadá, Australia y Argentina (**Figura 10**). En la actualidad, el consumo de trigo se sitúa alrededor de 578.5 millones de toneladas anuales y se estima un aumento de 14.4% en los próximos 10 años, superando los niveles de producción (Pallarés *et al.*, 2007).

Aproximadamente dos tercios del trigo producido se destina a la alimentación humana, mientras que el resto es utilizado para el uso directo y/o la preparación de piensos destinados a la alimentación de animales. El trigo, junto con el maíz y el arroz, es el alimento básico para millones de personas en los países en vías de desarrollo y constituye una parte importante de la dieta para otros muchos. En los países en vías de desarrollo, se produce en la actualidad el 44% de la producción mundial, comparado con el 30% que se producía a principios de los años 60. Las previsiones estiman que en 2020, el 67% del consumo de arroz estará localizado en los países en vías de desarrollo. A este importante incremento ha contribuido la mejora de la productividad. Actualmente en los países en vías de desarrollo, la tendencia es a un aumento del uso de cereales per cápita (consumo humano y piensos), y una reposición de las existencias. Sin embargo, pese a una producción mejorada, las importaciones de cereales aumentaron de forma continuada en los últimos cinco años (FAOSTAT).

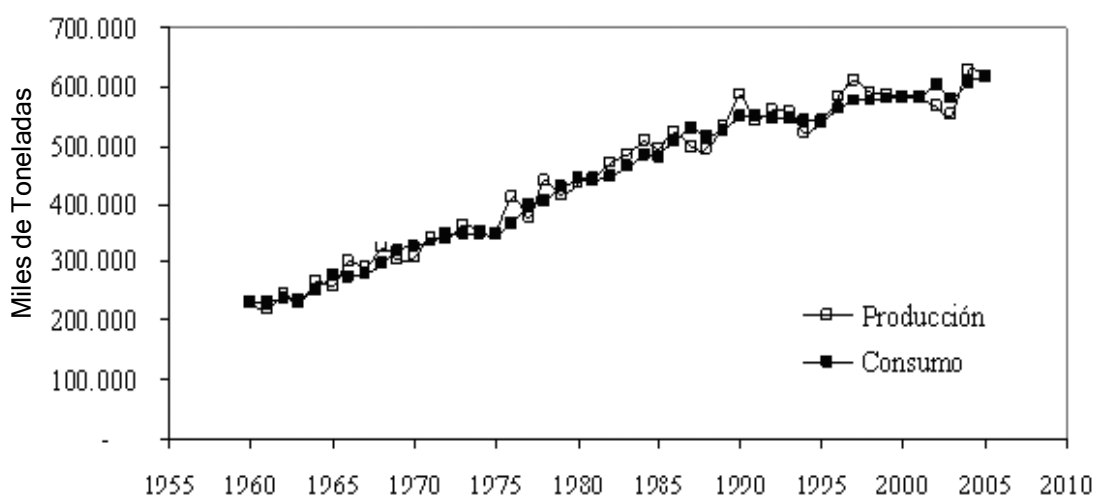


Figura 9. Evolución de la producción y consumo mundial de trigo en el periodo 1961-2007 (Fuente: FAOSTAT).

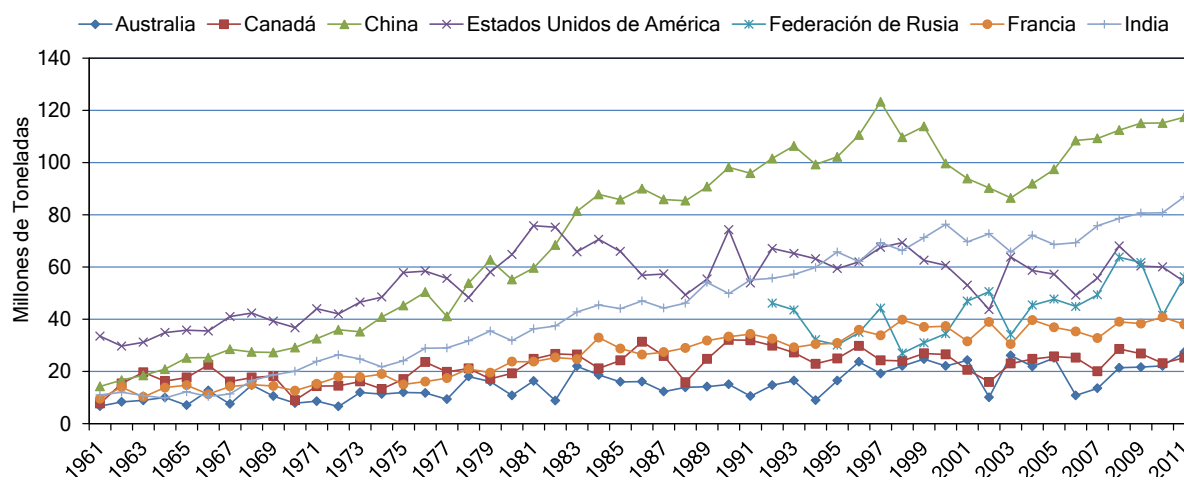


Figura 10. Evolución de la producción de trigo en los principales países productores en el periodo 1961-2011. (Fuente: FAOSTAT).

2.1.1.3. Botánica, cultivo de la planta y tipos de trigos.

El trigo es una planta anual herbácea perteneciente al género *Triticum* de la familia *Poaceae* y orden *Poales* dentro de la clase *Liliopsida* y división *Magnoliophyta*. La altura de la planta, incluyendo la espiga, puede variar desde los 30 cm hasta los 150 cm, en función de las condiciones de crecimiento y la variedad. El tallo del trigo es una caña hueca, poco ramificada, con seis nudos y entrenudos. El entrenudo superior, denominado pedúnculo sujeta a la característica espiga (Pallarés *et al.*, 2007).

Las espigas son inflorescencias compuestas por 15 a 25 espiguillas sésiles dispuestas en torno a un raquis o eje central (**Figura 11**). Cada espiguilla presenta externamente dos brácteas denominadas glumas y contiene tres a cinco antecios dispuestos sobre una raquilla. Cada uno de los antecios se compone de una lema o glumela inferior, de una pálea o glumela superior y de una flor (**Figura 12**). Entre la lema y la palea se situará el grano desarrollado a partir de la flor. Normalmente uno o dos antecios son estériles, generándose un máximo de dos a tres flores fértiles por espiguilla. Cada flor está compuesta por tres estambres y por dos estigmas plumosos que nacen directamente del ovario (**Figuras 13 y 14**); todas las estructuras de la flor se encuentran protegidas por dos brácteas: lema, la más externa y pálea, la más interna. La flor, que presenta autopolinización, proyecta sus estambres al exterior del antecio una vez que ha ocurrido la antesis (Kirby, 2002).



Figura 11. Espigas de trigo y estructura del raquis.

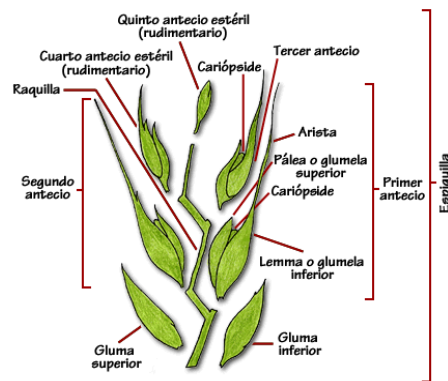


Figura 12. Detalle de una espiguilla de trigo compuesta por cinco antecios.

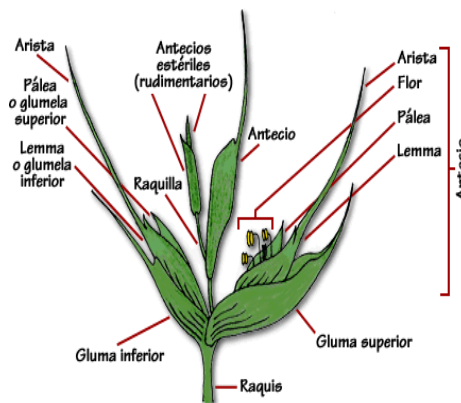


Figura 13. Componentes de una espiguilla de trigo.

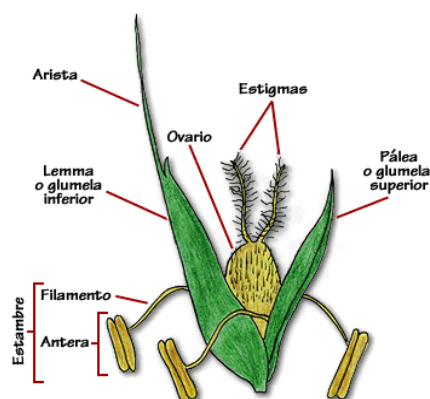


Figura 14. Estructura de un antecio de trigo.

Al tratarse de monocotiledoneas, los granos de los cereales tienen un solo cotiledón (Delcour y Hoseney 2010), presentando una testa fundida con el pericarpio por lo que el grano puede ser considerado un fruto de una sola semilla, conocido con el nombre de *Cariópside*. La forma del grano suele ser ovalada, y en su estructura (**Figura 15**) se pueden diferenciar tres partes principales: el salvado (parte externa), el germen o embrión y el endospermo (parte más interna). El germen, el cual es una estructura de pared fina que contiene a la nueva planta, sobresale en uno de los extremos del grano. En el otro lado generalmente se puede visualizar un mechón de pelos finos. El resto del grano se denomina *endospermo*, el cual constituye el alimento para el embrión, representando casi el 85% del peso del grano. El endospermo a su vez se encuentra rodeado por la capa de *aleurona* conformada por dos o tres capas de células. A lo largo de la cara ventral del grano hay una depresión (surco) generada por una invaginación de la *aleurona* y resto de *cubiertas*. En el fondo del surco hay una zona vascular fuertemente pigmentada. Las capas más externas del grano se consideran el pericarpio (derivado desde el ovario de la flor) y rodeado por este la testa o *abrigo de la semilla*. El *pericarpio* y la *testa*, junto con la capa de *aleurona*, conforman el *salvado de trigo* (McKevith, 2004).

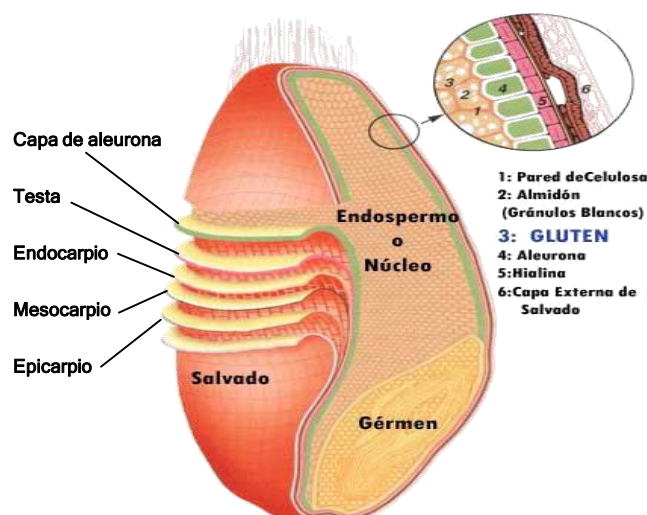


Figura 15. Estructura del grano (cariópside) de trigo.

En cuanto al ciclo vegetativo del trigo, en este se pueden distinguir tres períodos: *Período vegetativo*, que comprende desde la siembra hasta el comienzo del encañado; *Período de reproducción*, desde el encañado hasta la terminación del espigado; *Periodo de maduración*, que comprende desde el final del espigado hasta el momento de la recolección (Figura 16). El ciclo comienza con la germinación de los granos, tras pasar un periodo de latencia que se interrumpe con la liberación de hormonas (giberelinas) en el interior del germen. Estas hormonas desencadenan la producción y activación de enzimas como las amilasas y otras enzimas hidrolíticas (proteasas y glucanasas) que permiten que el germen se alimente de las sustancias de reserva del grano. A partir del germen crece la nueva planta, y una vez que existe un sistema radicular primario el grano ya puede aprovechar las sustancias nutritivas que se encuentran en el suelo (Leubner, 2012). En una primera fase de crecimiento, a partir de cada planta de trigo se generan nuevas plantas (hijuelos). A esta fase se le conoce como *ahijado*. Tras el ahijado, se produce el *encañado*, los tallos se estiran y los nudos se hacen claramente visibles. Una vez que el tallo ha crecido, aparece en la parte superior el *zurrón*, que posteriormente dará lugar a la espiga en lo que se conoce como fase de *espigado*. En el interior de cada espiga los estambres polinizan a los pistilos y se generan numerosos granos o semillas. Estos granos, en un principio, están vacíos. Durante la fase de maduración los granos se rellenan (granazón) y endurecen. Posteriormente los granos se secan y quedan listos para la recolección, almacenamiento y nueva siembra (Wheat Genomics, <http://www.wheatbp.net/>).

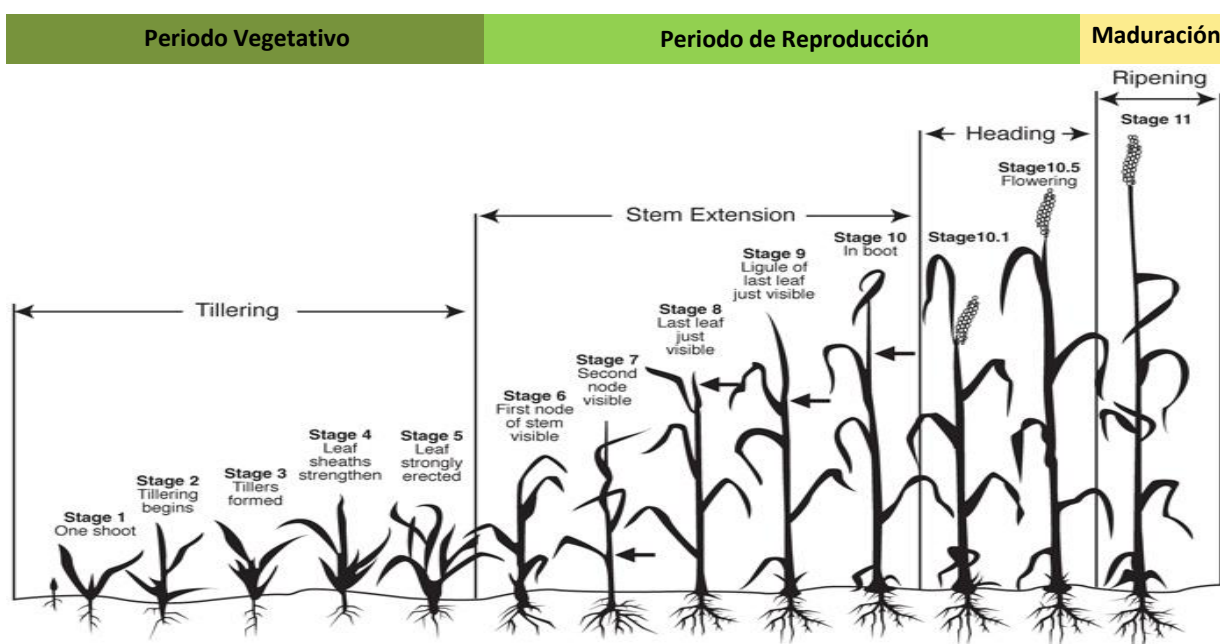


Figura 16. Etapas del desarrollo de la planta de trigo.

El tiempo necesario para que se produzcan los procesos de crecimiento de la planta son muy variables y dependen fundamentalmente de la variedad de la semilla. En este sentido, se pueden distinguir entre variedades denominadas de *ciclo corto* y de *ciclo largo*. Los trigos de *Ciclo largo* se siembran en otoño en el hemisferio norte, maduran durante la primavera y se cosechan al principio del verano. Por el contrario, los trigos de *Ciclo corto* se siembran en primavera, motivo por el cual se denominan “de primavera”, y se cosechan al final del verano. Los trigos de primavera tienen rendimientos significativamente inferiores que los trigos de invierno, pero el grano es de mejor calidad para el proceso de panificación debido a su mayor contenido en gluten y consistencia proteica.

El rendimiento de los cultivos y la calidad del trigo recolectado dependerán de múltiples factores, entre los que cabe destacar la variedad, la fertilización, la disponibilidad de agua, el control de malas hierbas y plagas, y el momento de la recolección. El trigo es una planta que crece a temperaturas comprendidas entre 3 y 33 °C, estando las temperaturas óptimas entre 10 y 25 °C. No requiere de una humedad excesiva y crece bien en zonas donde las precipitaciones anuales se sitúan entre los 375 y 800 mm. En el momento del espigado las necesidades hídricas aumentan; sin embargo, durante la maduración son preferibles condiciones más secas para facilitar el secado de los granos y evitar los fenómenos de germinación y desarrollo de hongos. En cuanto a las necesidades edafológicas son preferibles los suelos sueltos, profundos y con un pH entre 6.0 y 7.5.

En la producción y comercialización del trigo juegan un papel fundamental el rendimiento y el porcentaje de proteína, los cuales son en gran medida dependientes de las condiciones medioambientales durante la etapa de llenado del grano. El rendimiento es el parámetro resultante de los procesos que contribuyen a la deposición de almidón, mientras que el porcentaje de proteína, aunque no es independiente del rendimiento, refleja el metabolismo de nitrógeno, por lo que el control de ambos procesos es determinante del rendimiento. En general, cuanto mayor sea la producción de trigo menor será su contenido proteico, debido a la mayor limitación del nitrógeno presente en el suelo.

Los trigos se clasifican en función de la estación de cultivo, el color, la dureza y textura del endospermo (relacionada con la forma de romperse el grano durante la molienda) y por el contenido proteico (relacionado con las propiedades funcionales de la harina). La *dureza* de los trigos es uno de los parámetros cualitativos más importantes, relacionado con la forma en que el endospermo se rompe, teniendo un profundo efecto sobre sus características molineras, y en menor medida sobre las características panaderas, pero en último término se refleja sobre la calidad de sus productos derivados (Galante *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2006). Se trata de un rasgo genético cuantitativo y complejo, debido a su nivel polimórfico, en el que influyen directa o indirectamente una serie de factores como la dureza del grano, el contenido de proteínas, etc. El trigo más duro, también conocido como candeal, es el *T. durum*, cuya harina se utiliza en la fabricación de productos duros como la pasta. Los trigos duros producen una harina con mayor granulometría (sémola o semolina), arenosa y formada por partículas de forma regular que son, en su mayoría, células enteras del endospermo. Por contra los trigos blandos proporcionan una harina muy fina formada por fragmentos irregulares de las células del endospermo y partículas planas que se adhieren unas a otras. Además, la dureza afecta a la facilidad con que el endospermo se separa del salvado. En los trigos duros esta separación es más limpia y las células del endospermo permanecen intactas, sin embargo en los trigos blandos las células periféricas del endospermo tienden a fragmentarse y mientras unas se separan otras quedan unidas al salvado. La *fuerza* del trigo es una cualidad relacionada con sus aptitudes panaderas, es decir la capacidad de una harina para producir pan en piezas de gran volumen con miga de buena textura. Los trigos con esta aptitud suelen poseer un elevado contenido proteico y se les llama *trigos fuertes*; en contraposición, los trigos con contenido proteico bajo se denominan *flojos*. Estos últimos son ideales para la fabricación de galletas o productos de pastelería en los que no llega a desarrollarse el gluten, o porque no requieren fermentaciones con levadura.

Una de las clasificaciones más extendida es la norteamericana (Pallarés *et al.*, 2007) que separa los trigos en los siguientes grupos:

Trigo semolero o Trigo duro (Durum wheat). Es un trigo de primavera. Tiene una gran dureza y un alto contenido de proteína y gluten. Se utiliza para fabricar las sémolas y semolinas empleadas en la elaboración de pasta, y algunos tipos de pan en los países mediterráneos, debido a su mayor rendimiento en este proceso.

Trigo duro rojo de primavera (Hard red spring wheat). Es el trigo con mayor contenido de proteína, y se usa para la fabricación de pan de molde y cualquier otro derivado de panadería y bollería que requiera harinas de fuerza. También se emplea en mezclas con otros trigos.

Trigo duro blanco (Hard white wheat). Es un trigo con un contenido medio de proteína, muy próximo en cuanto a sus propiedades al trigo duro, excepto por el color y sus propiedades durante la molienda y la panificación. Se suele utilizar en la elaboración de panes fermentados, panes integrales, tortillas, noodles y destilería.

Trigo blando rojo (Soft winter red wheat). Tiene un contenido de proteína medio-bajo, y se usa para la fabricación de pan y la preparación de mezclas con otros tipos de trigos. También se usa en la fabricación de galletas, pasteles y otros productos de bollería y pastelería.

Trigo blando blanco (Soft white wheat). Tiene un contenido bajo de proteínas, pero un gran rendimiento. Confiere un color muy blanco a los productos, se usa en la fabricación de productos de alta calidad que requieran harinas flojas como pasteles, galletas, bollos y pasta oriental.

2.1.1.4. Composición química y aspectos nutricionales.

Al igual que el rendimiento del cultivo, la composición química del trigo puede variar según la región, clima, condiciones edafológicas, las condiciones de cultivo y el año de cosecha etc. En la **Tabla 1** se detalla la composición media del trigo.

Tabla 1. Intervalos de variación en la concentración (%) de los principales componentes del trigo.

Componentes	Composición (%)
Humedad	8.0 - 18.0
Almidón	60.0 - 68.0
Proteínas	7.0 - 18.0
Lípidos	1.5 - 2.0
Fibra cruda	2.0 - 2.5
Cenizas	1.5 - 2.0

Hidratos de carbono

Como en el resto de vegetales, los hidratos de carbono se forman a partir de dióxido de carbono y agua durante el proceso de la fotosíntesis. Constituyen una estructura de soporte en la planta y en la semilla, y la principal fuente de energía para muchas de las reacciones metabólicas. En la semilla se depositan para suministrar energía para los procesos que conllevan el desarrollo de la plántula.

Los mono- y disacáridos, y algunos oligosacáridos, como la rafinosa, se encuentran en el grano en cantidades pequeñas (fructosa 0.06%, glucosa 0.08%, galactosa 0.02%, sacarosa 0.54%, maltosa 0.05%, rafinosa 0.19%). La principal reserva de energía de los granos de cereales es el almidón, representando entre el 65-70% de la harina de trigo. El almidón se acumula en forma de gránulos que se encuentran en el interior de los amiloplastos. (Létang *et al.*, 1999; Rojas *et al.*, 2000; Román-Gutiérrez *et al.*, 2002). Las propiedades del almidón se deben principalmente a los dos polímeros que lo constituyen amilosa y amilopectina. Los gránulos de almidón, debido a su estado nativo parcialmente cristalino, experimentan distintos cambios o transiciones de fase cuando son sometidos a tratamiento térmico, entre los que destacan las llamadas gelatinización y retrogradación (Bilbao-Sáinz *et al.*, 2007; Xue *et al.*, 2010). Estos cambios influyen en el volumen final de los productos horneados y en su tendencia al endurecimiento, dependiendo, entre otros factores, de la proporción amilosa/amilopectina.

El endospermo del grano de trigo también contiene una pequeña proporción de polisacáridos, distintos del almidón, que nutricionalmente se incluyen dentro del grupo de las fibras, y que incluye a los polisacáridos no digeribles y las ligninas. Estos componentes son mayoritariamente arabinoxilanos (en cantidades relativamente altas) y β -D-glucanos solubles (en cantidades muy bajas), además de pequeños porcentajes de celulosa y glucomananos. A su vez, las paredes celulares de las capas de salvado de los granos presentan una apreciable cantidad de celulosa y arabinoxilanos.

Proteínas

En términos generales, las proteínas de los granos de trigo se pueden dividir en dos grandes grupos: las proteínas del gluten y aquellas que no contribuyen al gluten (resto de proteínas). Las primeras se denominan *proteínas de almacenamiento* y constituyen alrededor del 75-80% del total. Entre las proteínas no formadoras de gluten, que representan el 20-25% del contenido total, se encuentran la mayoría de enzimas presentes en el trigo.

Las proteínas de los cereales se clasifican en cuatro grupos en relación a su solubilidad (Osborne, 1907): albúminas (solubles en agua), globulinas (insolubles en agua y solubles en soluciones salinas diluidas), prolaminas (insolubles en agua y en soluciones salinas y solubles en alcohol al 70%), y glutelinas (insolubles en los solventes anteriormente mencionados y solubles en ácidos diluidos). La composición proteica del gluten está formada mayoritariamente por las gliadinas y gluteninas (también denominadas prolaminas y glutelinas).

En los cereales, las albúminas y las globulinas están concentradas en el germen, el salvado y las células de la capa de aleurona, y en menor medida en el endospermo. Las prolaminas y glutelinas sólo se encuentran en el endospermo, y sirven como fuente de nitrógeno durante la germinación. En el trigo, la composición aminoacídica de las glutelinas y las prolaminas son similares y se distinguen por las altas concentraciones de glutamina (1 de cada 3 aminoácidos) y de prolina (1 de cada 7 aminoácidos). Las propiedades de la harina de trigo para formar una masa cohesiva apta para ser horneada y producir pan, o para formar pastas, son derivadas de las proteínas presentes en el gluten, las cuales constituyen una red viscoelástica continua dentro de la masa (Lindsay y Skerritt, 1999; Shewry *et al.*, 2001). Cada una de las proteínas que forman el gluten tiene una función específica. Así las gliadinas son proteínas monoméricas responsables de la viscosidad del gluten, constituyendo un tercio de las proteínas de la harina. Las gluteninas, que forman macropolímeros, determinan la fuerza y la elasticidad del gluten.

Además del gluten, entre las proteínas presentes en el grano de trigo destacan, por su importancia funcional, las enzimas. En el grano intacto, seco y no germinado la actividad enzimática total es muy baja, pero cambia drásticamente cuando comienza la germinación (Demeke *et al.*, 2001). Las principales enzimas son α - y β -amilasas, enzimas desramificantes, celulasas, β -gluconasas y glucosidasas. También existen un gran número de enzimas proteolíticas, lipasas, esterasas y fosfatasas (Evers y Redman, 1973). Otras enzimas importantes son las fitasas, que catalizan la hidrólisis de ácido fítico a inositol y ortofosfato; las lipooxigenasas, que aceleran la peroxidación de ciertos ácidos grasos insaturados por el oxígeno y las polifenoloxidasas, que oxidan los fenoles a quinonas (Honold y Stahmann, 1968; Rani *et al.*, 2001).

Micronutrientes y otros componentes menores

En el grano de trigo se encuentran además distintos tipos de moléculas de naturaleza lipídica, como ácidos grasos, glicéridos simples, galactoglicéridos, fosfoglicéridos, esfingolípidos, tocoferoles además de hidrocarburos, esteroides y carotenoides. Estos últimos se describirán con más detalle más adelante al ser objeto de estudio en la presente memoria.

Los lípidos conteniendo ácidos grasos son los que se encuentran en mayor proporción; entre ellos predominan los triglicéridos, fundamentalmente con ácido palmítico, esteárico, oleico, linoleico y α -linolénico, encontrándose los mono- y diglicéridos en menor proporción. Los ácidos grasos saturados constituyen el 11-26% del total y los no saturados el 72-85%.

Los minerales están en muy pequeña proporción en el grano de trigo, y es aún menor su presencia en el endospermo (<1%). Destacan los fosfatos y sulfatos de potasio, magnesio y calcio. También se encuentran cantidades significativas de hierro, magnesio, zinc y cobre. (Pallarés *et al.*, 2007).

Con respecto a las vitaminas, los cereales son muy ricos en vitamina E y especialmente en vitaminas del grupo B, principalmente la niacina o vitamina B3 que se encuentra en el salvado. En menor cantidad se encuentran el ácido pantoténico o vitamina B5 y la piridoxina o vitamina B6, localizados en la capa de aleurona, la tiamina o vitamina B1 centrada en el escutelo y la riboflavina o vitamina B2 que se encuentra mayoritariamente en el salvado y el germen. En la **Tabla 2** se muestra la composición nutricional de la harina de trigo.

En los países en vías de desarrollo los cereales proporcionan más del 70% de la energía en la dieta y una gran parte de la ingesta de proteínas (Wrigley, 2009). El trigo y

resto de cereales, como ya se ha comentado antes, son una buena fuente de macronutrientes como hidratos de carbono de lenta asimilación, proteínas además de micronutrientes relevantes como fibra, vitaminas y sales minerales. Sin embargo no son capaces de proveer todos los aminoácidos esenciales, ya que son deficientes en algunos como la lisina (Shewry *et al.*, 2009). Por otro lado, el contenido de grasa de la harina de trigo es baja comparado con la mayoría de los alimentos (Chung *et al.*, 2009). Los fitoesteroles vegetales, esteroides y estanoles, que aportan también los cereales tienen implicaciones nutricionales-sanitarias relevantes ya que disminuyen la absorción del colesterol LDL, al presentar una estructura similar a este, previniendo las enfermedades cardiovasculares (Jong *et al.*, 2003), por lo que las investigaciones en este campo han suscitado bastante interés.

Tabla 2. Composición nutricional de la harina de trigo (por 100 g de producto).

Componentes	Harina blanca	Salvado	Germen	Harina integral
Calorías (kcal)	361	216	360	339
Proteína (g)	11.98	15.55	23.15	13.7
Grasa (g)	1.66	4.25	9.72	1.87
Hidratos de Carbono (g)	72.53	64.51	51.80	72.57
Cenizas (g)	0.47	5.79	4.21	1.6
Fibra (g)	2.4	42.8	13.2	12.2
Humedad (g)	13.36	9.9	11.12	10.26
<i>Minerales</i>				
Calcio (mg)	15	73	39	34
Hierro (mg)	0.9	10.57	6.26	3.88
Magnesio (mg)	25	611	239	138
Fósforo (mg)	97	1013	842	346
Potasio (mg)	100	1182	892	405
Sodio (mg)	2	2	12	5
Zinc (mg)	0.85	7.27	12.29	2.93
Cobre (mg)	0.18	1.0	0.8	0.38
Manganeso (mg)	0.79	11.5	13.3	3.8
Selenio (µg)	39.7	77.6	79.2	70.7
<i>Vitaminas</i>				
Tiamina (mg)	0.08	0.52	1.88	0.45
Riboflavina (mg)	-	0.06	0.58	0.37

Muchos de estos nutrientes se encuentran concentrados en zonas específicas del grano, por lo que el fraccionamiento de éste como paso previo a la molienda tiene implicaciones muy importantes a nivel nutricional. Los productos integrales proporcionan un aporte nutricional más completo que los refinados o las harinas blancas (Marquart *et al.*, 2002). Aunque desde la antigüedad se conocen las ventajas de una dieta rica en vegetales, y por tanto en fibra, no ha sido hasta finales del siglo XX cuando ha surgido una verdadera preocupación por el bajo nivel de fibra dietética presente en muchas dietas. El incremento de las enfermedades asociados a un déficit de fibra en la dieta provocó una revisión de la pirámide alimenticia (Fardet, 2010). La harina entera de trigo es una excelente fuente de fibra, particularmente de fibra insoluble mientras que la harina refinada, aunque no provee grandes cantidades de fibra, tiene un contenido apreciable de fibra soluble. El consumo recomendado de productos integrales difiere de un país a otro aconsejándose en la mayoría el incremento en dichos productos. En Estados Unidos, por ejemplo, se recomienda al menos tres raciones al día, es decir, aproximadamente 48 gramos de cereales integrales (Welsh *et al.*, 1994; USDA, 2005).

Este apartado sobre los aspectos nutricionales de los cereales en general y del trigo en particular, no podía pasar sin mencionar el contenido de nutrientes antioxidantes y fitoquímicos. Este grupo de nutrientes suscita un gran interés tanto desde el punto de vista científico-tecnológico como sanitario. La formación de radicales libres y el estrés oxidativo favorece la aparición de ciertas enfermedades degenerativas como algunos tipos de cáncer, y, en general, de aquellas asociadas a los procesos de envejecimiento (enfermedades coronarias, Alzheimer, artritis, etc.). El trigo también constituye una fuente excelente de compuestos antioxidantes (Liu, 2007; Fardet *et al.*, 2008). Entre los antioxidantes destacan algunos ácidos fenólicos (como el ácido ferúlico), el ácido fítico, el selenio, los tocoferoles y tocotrienoles, y los flavonoides. Algunos de esos fitoquímicos como el ácido ferúlico y los diferulatos son encontrados en niveles apreciables en los granos de cereales a diferencia de otros alimentos, como frutas y vegetales, lo que complementa el aporte total de antioxidantes cuando se consumen con éstos últimos (Liu, 2007). Sin embargo, existen otras moléculas de interés desde el punto de vista antioxidante, como son los carotenoides, de los que a pesar de la gran información que se dispone en otros tipos de alimentos (principalmente frutas y vegetales), ésta es escasa en el caso de los cereales, debido a su reducida presencia en éstos (Humphries *et al.*, 2004). Como se ya se ha indicado, el estudio de los carotenoides se abordará más adelante en detalle.

Al igual que ocurre con la mayoría de las vitaminas y minerales, las sustancias antioxidantes del trigo se concentran mayoritariamente en el salvado, en la capa de aleurona y en el germen, por lo que su contenido se reduce en los procesos de molturación para obtener harinas blancas (Yu *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2004a; Zhou y Yu, 2004a,b; Liyana-Pathirana y Shahidi, 2007). El contenido en antioxidantes depende de las condiciones de crecimiento y factores ambientales y también del tipo de trigo, es decir, del genotipo (Zhou *et al.*, 2004b; Zhou y Yu, 2004a,b; Liyana-Pathirana y Shahidi, 2007). La capacidad antioxidante también se altera por los tratamientos postcosecha, procesamientos a que se somete el trigo y sus derivados, y condiciones de almacenamiento (Zhou *et al.*, 2004a,b; Hidalgo y Brandolini, 2008b). El estudio del efecto del genotipo y de las condiciones de almacenamiento del grano y harinas sobre el contenido y composición de pigmentos carotenoides en cereales será uno de los principales objetivos del presente trabajo de investigación.

El refinamiento de los cereales puede no obstante tener efectos, en algunos casos, positivos ya que éstos contienen también en las capas externas de los granos los llamados *antinutrientes* (McKevith, 2004). Este es el caso de los taninos, los cuales provocan la precipitación de proteínas disminuyendo su digestibilidad. El ácido fítico y su sal, fitato, también se consideran en algunos casos factores antinutricionales ya que pueden unirse a minerales como hierro, calcio y zinc disminuyendo la absorción de los mismos (Grela, 1996; Graham *et al.*, 2000; Febles *et al.*, 2002).

2.1.1.5. Harinas de cereales: métodos de obtención, procesado y características.

La harina constituye el producto derivado de los cereales de mayor importancia en cuanto a sus múltiples aplicaciones. Básicamente, constituye, el polvo fino que se obtiene de la molienda de los granos de cereal y de cualquier materia rica en hidratos de carbono. La trituration del grano tiene como objeto obtener un tamaño de partícula más apto para las distintas aplicaciones industriales y culinarias. Con el tiempo, el hombre ha ido apreciando la posibilidad de obtener un producto en el que se hubieran eliminado las capas exteriores del grano, salvado y germen. En general, los sistemas de molienda han ido evolucionando hacia sistemas más eficientes energéticamente, que consigan obtener un tamaño de partícula lo más fino posible, y una separación más eficiente del salvado y germen.

Los avances más notorios en la molienda del trigo se produjeron en el siglo XVIII, con la aplicación de la energía mecánica a los molinos de piedra, y sobre todo en el siglo XIX, cuando se introduce el *Sistema Húngaro* de molturación por cilindros, basado en una reducción progresiva del tamaño de partícula. En la actualidad, este sistema es el

mayoritariamente utilizado para la obtención de harina de trigo en todo el mundo. La molturación en molino de piedra se utiliza aun en casos especiales, fundamentalmente para productos ecológicos y artesanales. El sistema utilizado para moler repercute en las características funcionales de las harinas, y en la valoración sensorial de los productos obtenidos a partir de ellas (Kihlberg *et al.*, 2004). Por otro lado, la composición química también se altera, debido a las temperaturas alcanzadas, mucho más elevadas en la molturación en molino de piedra que con cilindros. Esto provoca desnaturalización de proteínas, reduciendo el contenido en aminoácidos y además se produce un descenso en el contenido de ácidos grasos insaturados (Prabhasankar y Rao, 2001).

La industria molinera debe producir una amplia variedad de harinas adaptadas a las necesidades de sus clientes, influyendo el uso final de la harina, el país en el que se produzca, o las posibilidades analíticas del productor y el cliente. Es frecuente fijar unos límites de proteína, gluten, fuerza, tenacidad, extensibilidad y actividad amilásica. Para conseguir estas harinas el molinero debe elegir trigos que se ajusten a estas características, siendo práctica habitual el realizar mezclas de trigos, para conseguir el producto deseado (Posner y Hibbs, 2005). Una vez seleccionadas las partidas de trigo, éstas deben ser clasificadas, en función de criterios de calidad, y almacenadas en silos. Es frecuente realizar una limpieza grosera antes de almacenar el trigo en los silos, basada en una criba y una aspiración, y una limpieza más fina y exhaustiva antes de la molienda (Pallarés *et al.*, 2007).

El sistema de molturación por cilindros (*Sistema Húngaro*) se basa en el paso del trigo a través de parejas de cilindros que van reduciendo el tamaño de partícula progresivamente. Tras cada pasada el producto resultante es sometido a cribados especiales para eliminar el salvado y el germen (Ziegler y Greer, 1971). Para la correcta eliminación del salvado suele ser necesario humedecer los granos. Esta fase recibe el nombre de acondicionamiento, siendo habitual para los trigos el acondicionarlos a humedades que varían del 15 al 17%. La etapa de acondicionamiento requiere a su vez de periodo de reposo del grano al objeto de que la humedad penetre en el grano. De forma general, los trigos blandos necesitan menos humedad y presentan una menor resistencia a la penetración del agua que los trigos duros, los cuales necesitan tanto mayor contenido de humedad como también reposos más prolongados (Kent y Evers, 1994). En algunos países se recurre al acondicionamiento en caliente para reducir los tiempos de reposo (Krasteva *et al.*, 2008). Sin embargo, este sistema requiere un mayor gasto energético y no se deben sobrepasar los 45 °C, para evitar inactivación de enzimas y desnaturalización proteica. En algunos casos se utilizan temperaturas superiores con el fin de conseguir harinas

especiales, sin actividad enzimática y con baja fuerza. La temperatura de acondicionamiento también influirá en el rendimiento y el color de las harinas.

Una vez acondicionado el trigo, los granos pasan a la fase de molturación (**Figura 17**), que a su vez se divide en dos fases, trituration y compresión. En la fase de trituration el trigo pasa a través de parejas de cilindros estriados. Uno de los rodillos va más rápido (2.5 veces) que el otro, por lo que mientras el segundo retiene al grano el primero lo cizalla. Esta fase consta de 4 o 5 parejas de rodillos y en ella se busca separar el endospermo del salvado mediante un raspado progresivo. Tras cada paso por parejas de rodillos el producto obtenido pasa por equipos especiales llamados *cernidores* o *plansifters* (baterías de cribas) y sasores (mezcla de cribado y aspiración) para separar las distintas fracciones. Las fracciones más gruesas (salvado con endospermo adherido) se dirigirán hacia la siguiente pareja de rodillos de trituration. Las fracciones intermedias (sémolas) se dirigirán hacia los molinos de compresión para reducir el tamaño de partícula, y las fracciones que tengan la finura de la harina se dirigirán al silo de producto final correspondiente. Las sémolas en la fase de reducción atraviesan una serie de parejas de rodillos lisos o ligeramente rugosos. Entre cada pareja de rodillos el producto obtenido se somete a operaciones de separación similares a las utilizadas en la fase de trituration, de manera que las partículas más finas se dirigen a los silos de producto final y las más gruesas a los molinos de compresión correspondientes. En esta fase se consigue separar parte del salvado que se había roto en trozos más pequeños (salvado fino) y no se había conseguido separar en la fase de trituration. En esta fase también se separa el germen, ya que al pasar entre rodillos lisos se aplasta, debido a su elevado contenido en lípidos, forma escamas y puede separarse mediante tamizado.

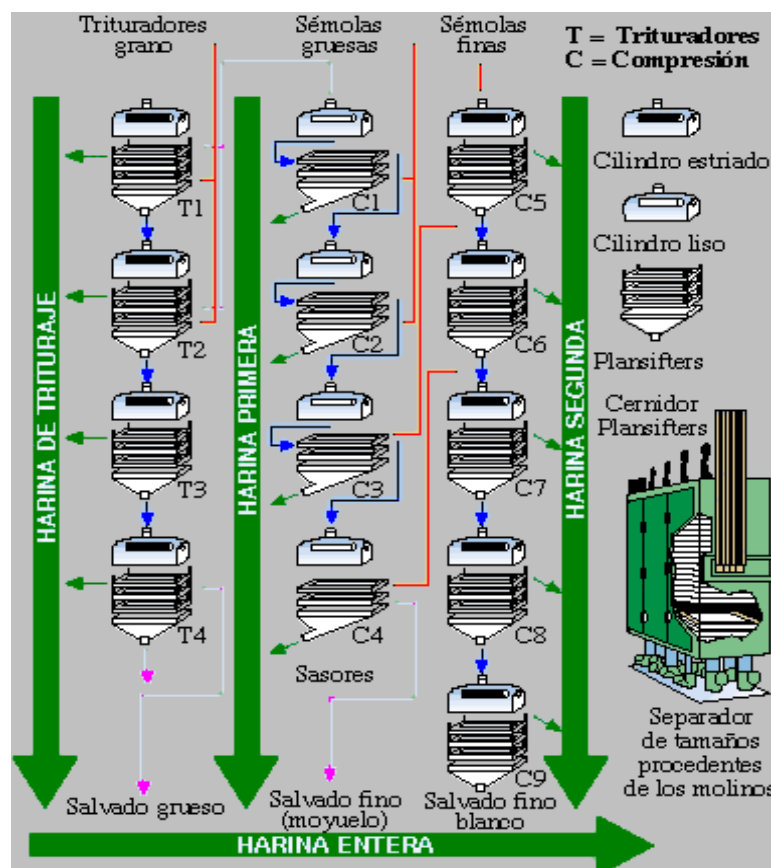


Figura 17. Esquema de la molienda secuencial con cilindros (*Sistema Húngaro*).

A cada una de estas fracciones, con la granulometría propia de las harinas finales se les denomina *pasadas de molienda*. La unión de estas pasadas de molienda, junto con las obtenidas en la fase de reducción, constituye la *harina final*. No obstante, cada pasada de molienda difiere en su composición del resto, especialmente en los porcentajes y tipos de proteínas, así de las distintas fracciones se obtienen harinas de diferentes calidades a partir de un mismo trigo (Prabhasankar y Rao, 1999). Además las distintas pasadas de molienda difieren en color, el cual se debe al contenido en pigmentos carotenoides y a fracciones de salvado (Oliver *et al.*, 1993; Humphries *et al.*, 2004; Konopka *et al.*, 2004), en la composición lipídica (Prabhasankar y Rao, 1999; Konopka *et al.*, 2004), porcentaje y tipo de fibra, actividad enzimática (Marsh y Galliard, 1986; Rani *et al.*, 2001) y actividad antioxidante (McCallum y Walker, 1990; Zhou *et al.*, 2004a; Beta *et al.*, 2005; Liyana-Pathirana y Shahidi, 2007). Al final de la fase de trituración también se obtiene una fracción compuesta por salvado grueso, que se suele destinar para alimentación animal debido a su contenido en fibra, proteínas y vitaminas. Este salvado suele llevar algo de endospermo adherido ya que su separación no sería rentable y afectaría a la calidad final de la harina.

Finalmente, a menudo a las harinas se le añaden una serie de aditivos. Los tipos y las cantidades añadidas están regulados por Ley y se debe indicar en el etiquetado de la harina. Entre los distintos tipos de aditivos, se encuentran los que mejoran el contenido nutricional de la harina, los que están destinados a mejorar la manipulación de la masa panaria y sus propiedades o los aditivos blanqueadores (Stauffer, 1990). Con respecto a los primeros, los enriquecimientos en vitaminas y minerales son muy habituales (Poletti *et al.*, 2004). Se le añade a harinas blancas hierro y vitaminas del grupo B. Actualmente en Norte América, todos los productos horneados y de pasta están enriquecidos.

Normalmente las harinas requieren de periodos de almacenamiento con aireación para favorecer el blanqueamiento de éstas al favorecerse la oxidación de los pigmentos y además una mayor cohesión entre las proteínas que formarán el gluten. Sin embargo, el envejecimiento natural de las harinas no es rentable a nivel industrial, ya que se requieren tiempos prolongados, de semanas e incluso meses y tales almacenamientos en silos favorecen también contaminación por mohos, o ataque de roedores e insectos. Es por ello que se recurre a agentes de maduración, los cuales son aditivos que producen cambios deseados en las propiedades de las harinas durante su almacenamiento. Los agentes blanqueadores más comunes, que provocan una degradación de los pigmentos carotenoides en las harinas son el peróxido de benzilo y el cloro gaseoso. El primero es usado muy frecuente en todo tipo de harinas siendo extremadamente efectivo blanqueando pero no produce ningún efecto de maduración. Por el contrario, el cloro gas solo es utilizado en harina de repostería, siendo éste además de un agente blanqueante, un agente de maduración que provoca un ablandamiento del gluten, haciendo que el almidón absorba el agua más rápidamente. Por el contrario, el bromato potásico y el ácido ascórbico son agentes de maduración que fortalecen el gluten y ellos se usan con harinas procedentes de trigos duros (Amendola y Rees, 2003; Figoni, 2008).

Resulta habitual el enriquecimiento de las harinas para una mejora de sus propiedades funcionales, mediante la adición de ciertas enzimas que tienen efectos importantes para la obtención de algunos productos. Entre las enzimas que se añaden destaca la amilasa, la cual provoca la hidrólisis del almidón proporcionando el azúcar para mejorar los procesos fermentativos de levaduras. Transglutaminasas, transferasas que producen uniones intra e intermoleculares entre un grupo ϵ -amino de un residuo de lisina y un grupo γ -carboxiamida de un residuo de glutamina, obteniendo un entrecruzamiento covalente de las proteínas que conforman el gluten favoreciendo así la estructura compacta de éste. Otras enzimas que se añaden por su capacidad oxidante son las glucosas oxidasas, hexosas oxidasas y lacasas favoreciéndose la formación en este ambiente oxidante de los puentes disulfuro entre las proteínas que conforman los polímeros del

gluten y se consigue un efecto de gelatinización sobre los pentosanos (Caballero *et al.*, 2007a,b).

En las últimas décadas se ha incrementado el uso de harinas integrales debido a su mayor valor nutricional y principalmente al aporte de fibra. Estas harinas pueden obtenerse mediante la molturación del grano entero en molinos de piedras o de martillos. Sin embargo la mayoría de harinas integrales presentes en el mercado se elaboran mezclando la harina blanca con la correspondiente cantidad de salvado. El salvado puede incorporarse con distintos tamaños de partícula. En estas harinas no se suele incorporar el germen, debido a los problemas de enranciamiento que presenta y la consiguiente reducción de la vida útil de la harina. Por tanto este tipo de harinas con salvado no se deberían denominar integrales, al faltarles el germen (Pallarés *et al.*, 2007).

2.1.2. Tritordeum: un nuevo cereal de especial relevancia en la mejora vegetal.

2.1.2.1. Nuevos cultivos anfiploides sintéticos: origen de tritordeum.

La tribu *Triticeae*, la cual incluye las especies de trigo, cebada y centeno, es una serie de poliploides que se encuentran estrechamente relacionados presentando todos ellos un número básico de 7 cromosomas. Dicha relación entre los cromosomas de estas tres especies es capaz de generar híbridos anfiploides fértiles entre diferentes miembros cultivados de esa tribu, siendo incluso posible la producción de híbridos entre especies cultivadas y sus parientes silvestres. Así, el cruzamiento de dos plantas cultivadas, *T. turgidum* y *Secale cereale* L. ($2n=2x=14$, con dotación genómica RR) dio lugar al hexaploide Triticale (x *Triticosecale* Wittmack, $2n=6x=42$, AABBRR) (Martín *et al.*, 1999; Feuillet *et al.*, 2007). Este primer híbrido obtenido a partir del trigo y el centeno fue generado en Escocia en 1876, aunque el primer híbrido fértil no se obtuvo hasta 1938. Desafortunadamente, las características de calidad del trigo no fueron transferidas al Triticale, por lo que es usado casi exclusivamente para alimentación animal. Cabe destacar que aunque el comienzo de la mejora sistemática de Triticale se desarrolló en los años sesenta, la producción ha crecido sustancialmente desde dos millones de toneladas a finales de los años ochenta hasta cerca de quince millones de toneladas en 2005. El Triticale es así un nuevo cultivo, que ha encontrado su lugar, debido a que presenta un mayor rendimiento relativo a sus especies parentales, y la habilidad para crecer en lugares que no son apropiados para la producción de trigo o cebada.

Desde comienzos del siglo XX, se ha tenido interés en el cruce de trigo con la cebada, pero los anfiploides, x *Tritordeum* Ascherson et Graebner, eran obtenidos solo

cuando se utilizaban parientes silvestres del género *Hordeum*, como *H. chilense*. *H. chilense* Roem. et Schult. es una cebada silvestre diploide, ($2n=2x=14$), de la sección *Anisolepsis* Nevski, la cual es una especie extremadamente variable incluida en un grupo heterogéneo de especies suramericanas con genoma H del género *Hordeum* (Bothmer y Jacobsen, 1985; Tobes *et al.*, 1995). El empleo de esta especie silvestre en los programas de mejora se ha centrado en dos áreas: en primer lugar, en el desarrollo de anfiploides entre *H. chilense* y trigos tetraploides o hexaploides, tritordeum, para poder obtener un nuevo cereal, y en segundo lugar, en la introgresión hacia el trigo de nuevos rasgos de interés. Se han realizado cruzamientos con especies del género *Aegilops*, *Agropyron*, *Dasypyron*, *Hordeum*, *Secale* y *Triticum*, y obtenido líneas de adición disómica de *H. chilense* en *T. aestivum*, lo cual se traduce en una buena herramienta para la mejora del trigo (Hernández *et al.*, 2001b). Alguno de los atributos transferidos son: resistencia al nematodo *Meloidogyne naasi* sobre el cromosoma $1H^{ch}$; tolerancia salina sobre los cromosomas $1H^{ch}$, $4H^{ch}$ y $5H^{ch}$; resistencia a hongos de la especie *Septoria* sobre el cromosoma $4H^{ch}$; resistencia a las enfermedades fúngicas conocidas como carbón cubierto del trigo y carbón hediondo y alto contenido en pigmentos carotenoides (Martín *et al.*, 1999), ambos localizados sobre el cromosoma $7H^{ch}$. Este último aspecto se abordará en mayor detalle en la sección dedicada a los pigmentos carotenoides.

Los primeros anfiploides entre *H. chilense* y *T. aestivum* L. em. Thell, cv. Chinese Spring ($2n=8x=56$, $H^{ch}H^{ch}AABBDD$) octoploides, presentaban una fertilidad extremadamente baja y una alta frecuencia de aneuploidías, rasgos que limitaban su posible uso como cultivo (Martín y Chapman, 1977). Sin embargo, los tritordeum hexaploides (*H. chilense* x *T. turgidum* conv. *durum*, $2n=6x=42$, $H^{ch}H^{ch}AABB$), mostraban una baja frecuencia de aneuploides, una amplia variación en la tasa de crecimiento y un grado óptimo de fertilidad (Martín y Sanchez-Monge Laguna, 1982). Esos y otros caracteres agronómicos tales como biomasa, número de espiguillas/espigas, tamaño de semilla y contenido de proteínas, lleva a considerar a los tritordeum hexaploides como un posible nuevo cultivo. De forma sistemática la generación de estos híbridos se produce por duplicación cromosómica de los híbridos obtenidos de la F1 mediante tratamiento con colchicina (**Figura 18**).

2.1.2.2. Desarrollo agronómico y características fisiológicas.

El estudio del potencial agronómico de Tritordeum, fue impulsado por el hecho de que se observó que esta nueva especie presentaba una estabilidad cromosómica, buena fertilidad, buen tamaño de semilla (**Figura 19**), morfología vegetal similar al trigo y un alto

contenido en proteínas (Martín *et al.*, 1999). Dicho estudio se realizó mediante pruebas comparativas en las que se evaluó, aparte de tritordeum ($H^{ch}H^{ch}AABB$), anfiploides hexaploides como el trigo harinero sintético (AABBDD) y triticales (AABBRR), así como sus parentales de trigo duro (AABB). Tanto los tritordeum iniciales como el trigo harinero sintético presentaban granos más pequeños y menor biomasa e índices de productividad y cosecha que sus respectivas líneas parentales de trigo duro y triticales. Por otro lado, el contenido de proteínas del trigo harinero sintético era más bajo que el de sus parentales mientras que el caso de tritordeum, éstos presentaban un contenido más alto que sus parentales de trigo duro. Lo que proporcionaba evidencias del potencial de tritordeum para llegar a ser un cultivo después de suficientes esfuerzos de mejora.

Recientemente, se han realizado diversos estudios sobre la contribución a la mejora agronómica de tritordeum con respecto a la aportación de los distintos parentales (Atienza *et al.*, 2007a). Aunque la información genética de los caracteres estudiados en su mayoría está controlada por el núcleo, se conoce la influencia del genoma citoplásmico sobre ciertos caracteres. Uno de los atributos más utilizados en los programas de mejora para muchas especies, ha sido la esterilidad masculina asociada al citoplasma. Aunque la influencia del genoma citoplásmico sobre el fenotipo no está todavía demasiado explorada, su contribución se ha descrito en varios rasgos como tolerancia al calor, resistencia al virus del mosaico amarillo en la cebada (Matsui *et al.*, 2002) y a la infección de hongos del género *Fusarium*, tolerancia a deficiencias en hierro y a la respuesta sobre el cultivo de anteras (Hernández *et al.*, 2001a). Inicialmente, todos los tritordeum hexaploides presentaban el citoplasma de *H. chilense*, ya que esa especie era siempre usada como parental femenino. Como se indicó anteriormente, contrastado la influencia del citoplasma en los caracteres agronómicos de los cultivos, se desarrollaron distintos experimentos con el objetivo de evaluar este aspecto en tritordeum. De esta manera, se obtuvieron tritordeum que portaban citoplasmas de *T. aestivum* y *T. turgidum* por repetidos retrocruzamientos. Sin embargo, esas sustituciones no afectaron mucho a los caracteres agronómicos, exceptuando el caso de rendimiento por planta, el cual fue más bajo en el caso de tritordeum con citoplasma de *T. turgidum* (Hernández *et al.*, 2001a; Atienza *et al.*, 2007b).

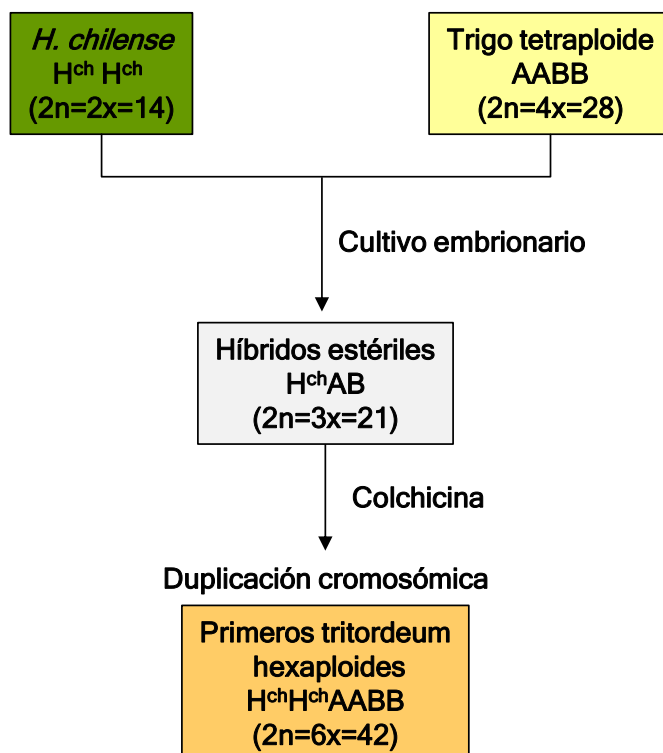


Figura 18. Protocolo de obtención de Tritordeum.



Figura 19. Granos de *H. chilense*, trigo duro y tritordeum hexaploide.

Actualmente, Tritordeum está sujeto a un programa de mejora para conseguir su uso como un nuevo cereal. Hasta la fecha, después de varios años, su rendimiento potencial se ha confirmado, y se han obtenido líneas que muestran tolerancia a estrés hídrico y altas temperaturas, resistencia a pesticidas y enfermedades y una buena calidad harinera-panadera aunque inferior al del trigo harinero (Álvarez *et al.*, 1995). Este programa de mejora ha proporcionado líneas totalmente fértiles, con rendimientos alrededor del 80% con respecto a los trigos comerciales y con un contenido en proteínas aproximadamente un 5% superior a las del trigo (Martín *et al.*, 1999). Otro factor a tener en cuenta, y de especial relevancia en esta tesis doctoral, es la obtención de líneas avanzadas de tritordeum que muestran un contenido en pigmentos carotenoides muy superior al del trigo (Álvarez *et al.*, 1994, 1995; Martín *et al.*, 1999; Atienza *et al.*, 2007b), aspecto en el que se centrará el presente trabajo de investigación.

Con respecto a las características fisiológicas, tanto el metabolismo de nitrógeno como su actividad fotosintética han sido estudiados en tritordeum y en sus parentales. Esos procesos son esenciales para determinar el crecimiento y el rendimiento de la mayoría de las especies cultivadas. Tritordeum hexaploides exhibe un sistema de captación con mayor afinidad para nitrato que el de sus parentales de trigo (Barro *et al.*, 1991), indicando que tritordeum tiene un mayor potencial para la movilización del nitrógeno desde los tejidos vegetativos, y que esos rasgos podrían ser atribuidos a *H. chilense*. Así mismo, se ha observado que Tritordeum muestra mayor conductancia estomática y fotosíntesis que el trigo y el triticale bajo condiciones deficitarias de agua. Estos rasgos podrían hacer a tritordeum un cultivo óptimo para climas mediterráneos calurosos y secos (Martín *et al.*, 1999).

2.1.2.3. Propiedades y calidad harino-panaderas.

Normalmente, los nuevos cultivos anfiploides sintéticos presentan unas características harino-panaderas deficientes para el consumo humano, como es el caso del triticale o los híbridos entre el trigo y el arroz (Álvarez *et al.*, 1995). Inicialmente, los análisis realizados a tritordeum indicaron que sus características eran resultado de su propia anfiploidía, pero trabajos posteriores arrojaron datos sobre interacciones entre las proteínas de almacenamiento del endospermo de ambos genomas, cebada y trigo, como responsables de las características de tritordeum (Álvarez *et al.*, 1994). La calidad de la harina de trigo depende parcialmente de dichas proteínas de almacenamiento, gluteninas y gliadinas, codificadas por genes que se encuentran agrupados en nueve locis complejos sobre seis cromosomas diferentes. De entre estas proteínas, las subunidades de elevado

peso molecular de gluteninas (HMW), codificadas por los locis *Glu-A1*, *Glu-B1* y *Glu-D1*, localizados sobre los brazos largos de los cromosomas 1A, 1B y 1D respectivamente, han sido reconocidas por tener una influencia relevante en la calidad harino-panadera (Nevo y Payne, 1987; Ballesteros *et al.*, 2003). En el caso de tritordeum hexaploides, cuando se realizaron análisis de sus harinas, se observó que poseía propiedades viscoelásticas similares a las de algunos cultivares de trigo harinero más comunmente cultivados. Esto, junto con el hecho de que exhibe un bajo carácter vítreo, poca dureza y un alto rendimiento de harina sugirió que tritordeum era más apropiado para destinarse a producir pan que pasta (Álvarez *et al.*, 1992, 1994, 1995, 1999a; Martín *et al.*, 1999; Ballesteros *et al.*, 2003). Estos resultados sorprendieron debido a que tritordeum hexaploides no presenta genoma D, el cual está asociado con las propiedades viscoelásticas del trigo harinero. Por lo que se le atribuye tales características a variaciones en las proteínas del endospermo del genoma H^{ch} . Los estudios comparativos realizados con tritordeum, triticale y trigo confirmaron que tritordeum presenta características similares a la del trigo harinero, pero diferentes a las de triticale y trigo duro o semolero. Las diferencias entre los parentales de trigo y sus tritordeum derivados eran más grandes en hexaploides que en tritordeum octoploides. Ya que en tritordeum octoploides, la presencia del genoma D parece moderar los efectos del genoma H^{ch} (Álvarez *et al.*, 1994, 1995; Martín *et al.*, 1999).

En este sentido, el programa de mejora de tritordeum está dirigido a potenciar dichas propiedades harino-panaderas y conseguir el uso de tritordeum en la industria similar al del trigo harinero. Los análisis mediante electroforesis SDS-PAGE sobre las proteínas del endospermo, han indicado que el patrón de proteínas del anfiploide era resultado de la adición de los patrones de ambos progenitores. La mayoría de las proteínas procedentes de *H. chilense* son sintetizadas por locis sobre el cromosoma $1H^{ch}$, aunque algunas α -hordeinas son codificadas por locis sobre los cromosomas $5H^{ch}$ y $7H^{ch}$. Se han encontrado hasta la fecha, seis locis sobre el cromosoma $1H^{ch}$, y más de tres variaciones alélicas para algunos de esos locis, los cuales influyen sobre la fuerza del gluten y por tanto sobre la calidad de las características harino-panaderas de tritordeum. Sin embargo, esta variación parece ser insuficiente para obtener tritordeum con un alto grado de calidad panadera, ya que sigue mostrando valores más bajos, al igual que los tritordeum iniciales, que el trigo harinero (Álvarez *et al.*, 1999a; Ballesteros *et al.*, 2003), por lo que se precisa la búsqueda de nuevas variantes alélicas para esos locis que pudieran ser útiles en el programa de mejora de tritordeum.

Por último, como se indicó con anterioridad, una característica llamativa de las harinas de tritordeum tanto de hexaploides como de octoploides, es su intenso color amarillo debido a un mayor contenido en pigmentos carotenoides (Álvarez *et al.*, 1994,

1995; Martín *et al.*, 1999; Atienza *et al.*, 2007b). La caracterización molecular de éste rasgo, atribuido al genoma H^{ch}, se desarrollará en la presente memoria de investigación.

2.2. Pigmentos carotenoides.

Entre todos los pigmentos presentes en los organismos vivos, no cabe duda de que los carotenoides constituyen el grupo de pigmentos más ampliamente distribuido en la naturaleza. Los pigmentos carotenoides están presentes en todo el Reino Vegetal, tanto en tejidos fotosintéticos como no fotosintéticos, en bacterias, hongos y en animales (Fraser y Bramley, 2004; Howitt y Pogson, 2006). Estos últimos son incapaces de sintetizarlos *de novo*, existiendo excepciones como ciertos áfidos y otros insectos (Moran y Jarvik, 2010), por lo que deben incorporarlos a través de la dieta. Los carotenoides son moléculas isoprenoides de naturaleza lipídica, localizándose en estructuras de membrana de orgánulos vegetales especializados, cloroplastos (en tejidos verdes) o cromoplastos (en tejidos amarillos, naranjas o rojos), lo cual caracteriza a la célula vegetal. De forma general, los carotenoides se pueden encontrar en todas las partes de la planta: raíces, hojas, flores, frutos y semillas (Britton y Hornero-Méndez, 1997). En el Reino Animal contribuyen al color de numerosas aves, insectos e invertebrados marinos. En consecuencia, no solo intervienen en procesos esencialmente fisiológicos y de desarrollo vegetal, sino que además se les atribuye funciones importantes en relación a la salud y nutrición de los organismos consumidores, incluyendo a los humanos (Farré *et al.*, 2010a).

El término *caroteno* fue acuñado por Wackenroder en 1831 para referirse al pigmento naranja aislado a partir de zanahorias (*Daucus carota*). Posteriormente, en 1837, Berzelius se refería con el nombre de *xantofilas* al pigmento amarillo de las hojas otoñales. No obstante, tuvo que transcurrir bastante tiempo, hasta que en 1906 el botánico ruso Mikhail Tswett consiguiera separar los pigmentos de un extracto alcohólico de hojas verdes, inventando la cromatografía. Hacia 1929 los trabajos de von Euler, Karrer y Moore demostraron la relación entre los carotenoides y la vitamina A, siendo entonces cuando el interés por estos compuestos fue creciendo, lo que unido al desarrollo continuo de las técnicas analíticas ha permitido que en la actualidad se conozcan cerca de 700 formas estructurales (Britton *et al.*, 2009).

2.2.1. Estructura, nomenclatura y propiedades físico-químicas.

En términos estructurales, los carotenoides presentan un esqueleto de cuarenta átomos de carbono (C40), derivado de la unión de dos moléculas de un intermediario de

veinte átomos de carbono (geranilgeranil difosfato, C₂₀) a su vez constituidas cada una por cuatro unidades de isoprenoide (C₅), originándose fitoeno, precursor primario del amplio rango de carotenoides encontrados en la naturaleza. La molécula de fitoeno experimenta una serie de desaturaciones sucesivas (hasta cuatro), lo que produce una extensión del sistema de dobles enlaces conjugados, y consecuentemente del cromóforo, lo cual influye en sus propiedades físicas (incluyendo las cromáticas), químicas y bioquímicas. Cambios estructurales sucesivos, tales como ciclación de uno o de ambos extremos, hidroxilación o introducción de otras funciones oxigenadas, completan las reacciones que dan lugar a todas las estructuras de esta familia de pigmentos (Britton y Hornero-Méndez, 1997; Fraser y Bramley, 2004; Taylor y Ramsay, 2005). El esqueleto C₄₀ se reduce en ocasiones en los llamados apocarotenoides o diapocarotenoides los cuales derivan de la pérdida de fragmentos de uno o de ambos extremos de la molécula. (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1997; Van den Berg *et al.*, 2000). Los carotenoides pueden ser clasificados en dos grupos: carotenos, los cuales son estrictamente hidrocarburos, y xantofilas, las cuales derivan de los primeros y contienen funciones oxigenadas. Existen estructuras acíclicas como licopeno, o conteniendo un anillo de cinco o seis carbonos en uno o en ambos extremos de la molécula, como β -caroteno. En la **Figura 20** se muestran las estructuras y el sistema de numeración utilizando licopeno y β -caroteno como modelo de carotenoide acíclico y cíclico, respectivamente.

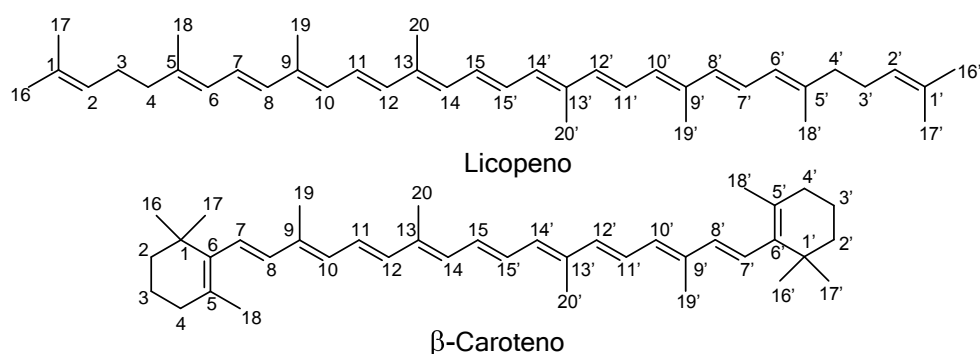


Figura 20. Esqueleto C₄₀ y sistema de numeración de carotenoides.

Tradicionalmente, los nombres triviales que recibían los carotenoides, se referían a la fuente natural de la cual habían sido extraídos. Por ejemplo, zeaxanteno aislado por primera vez del maíz (*Zea mays*), β -caroteno de las zanahorias (*Daucus carota*) y licopeno del tomate (*Solanum lycopersicum*). Pero debido a que este sistema no proporciona información estructural, se definió posteriormente una nomenclatura semisistemática,

aprobada por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), que reflejaba información estructural de la molécula y además el caroteno del que deriva. La IUPAC, publicó en 1974 un compendio de reglas para la nomenclatura de los carotenoides (IUPAC, 1974). En esta nomenclatura, se utilizan letras griegas para designar los grupos terminales que pueden estar presentes en los carotenoides (Weedon y Moss, 1995). En la **Figura 21** se muestran los siete grupos funcionales que se han encontrado en carotenoides naturales, y que se designan utilizando prefijos griegos: β (beta), γ (gamma), ϵ (épsilon), κ (kappa), χ (chi), ψ (psi) y ϕ (phi). En la **Figura 22** se incluyen las estructuras de algunos carotenos y xantofilas comúnmente encontrados en vegetales.

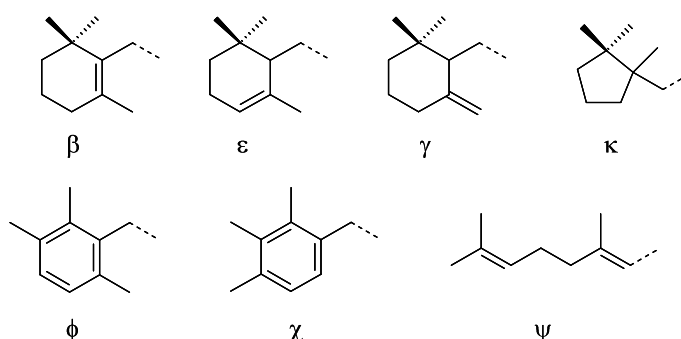


Figura 21. Estructuras químicas de grupos terminales encontrados en carotenoides.

La presencia de un gran número de dobles enlaces conjugados hace posible numerosos isómeros geométricos (*ZE*, también llamados *cis/trans*). La forma más abundante en la naturaleza es el isómero todo-*trans* (Chandler y Schwartz, 1987), aunque existen algunas excepciones, tales como la bixina en las semillas del achiote (*Bixa orellana*) o el prolicopeno, presente en algunas variedades de tomate, los cuales presentan enlaces en configuración *Z* o *cis* (Britton y Hornero-Méndez, 1997; Mínguez-Mosquera *et al.*, 2002). Muchos carotenoides tienen centros quirales debidos a la presencia de átomos de carbono asimétricos (Weedon y Moss, 1995). Los compuestos pueden existir en diferentes formas estereoisoméricas, isómeros ópticos o enantiómeros. Los isómeros ópticos presentan idénticas propiedades exceptuando para su interacción con luz polarizada. Normalmente, los carotenoides en la naturaleza existen sólo en una de las formas enantioméricas posibles, debido a que la biosíntesis es enantioselectiva. Aunque existen excepciones como zeaxanteno en la zona de la macula del ojo humano (Bone *et al.*, 1993; 1997).

Los carotenoides son moléculas lipofílicas siendo la mayoría insolubles en agua, exceptuando los casos en los que existen grupos funcionales altamente polares (Craft y Soares, 1992). En medio acuoso tienden a formar agregados o adherirse inespecíficamente a superficies. Son solubles en solventes orgánicos no polares como tetrahidrofurano, hexano, metanol, etanol, acetona, eter dietílico, etc. Uno de los factores que más influye en su solubilidad es la esterificación natural con ácidos grasos que presentan muchas xantofilas, incrementando su carácter lipofílico (Britton, 1985; Breithaupt y Bamedi, 2001).

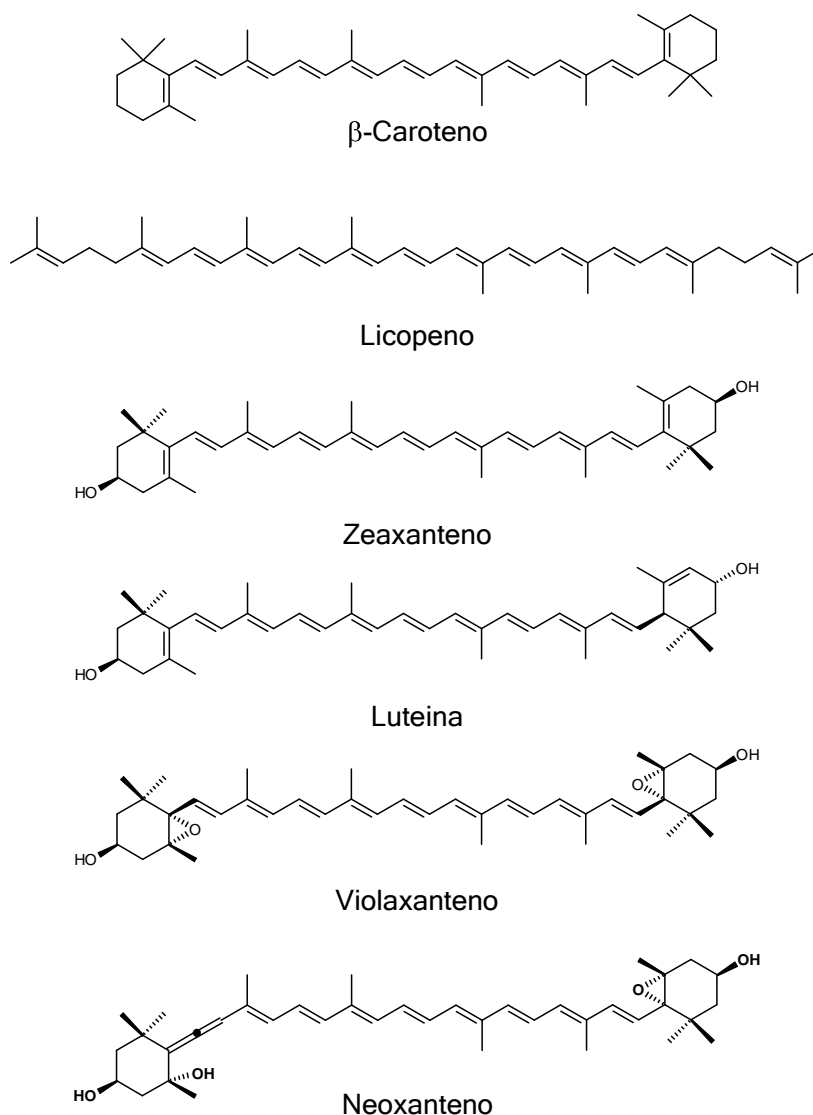


Figura 22. Carotenos y xantofilas comúnmente presentes en frutos y vegetales.

Por otro lado, la presencia en su estructura del sistema de dobles enlaces conjugados es responsable de una de las características más distintivas de este grupo de pigmentos: la absorción de luz visible, proporcionándoles una coloración que va desde el amarillo pálido hasta la tonalidad rojiza (**Figura 23**). La cadena de polieno constituye un sistema rico en electrones reactivos lo cual les hace altamente susceptibles a reaccionar con compuestos electrofílicos. Tales reacciones son responsables de la inestabilidad de los carotenoides hacia condiciones oxidantes como luz o calor. En presencia de oxígeno, los carotenoides se autooxidan, proceso que ha sido descrito como “blanqueamiento”. La reacción de los carotenoides con los agentes oxidantes o radicales libres depende de la longitud de la cadena de polieno y de la naturaleza de los grupos terminales (Palozza y Krinsky, 1992; Rice-Evans *et al.*, 1997). La posición de los máximos del espectro de absorción depende del número de dobles enlaces conjugados que presenta el cromóforo, encontrándose en la región de 400-550 nm. Dichos máximos de absorción son generalmente indicados con números romanos (I, II, III) (**Figura 24**). La introducción de un nuevo doble enlace conjugado dentro del cromóforo, provoca un desplazamiento batocrómico de 20 a 22 nm de los máximos de absorción, aunque dicho efecto depende de los grupos terminales que presente la molécula, y del disolvente.

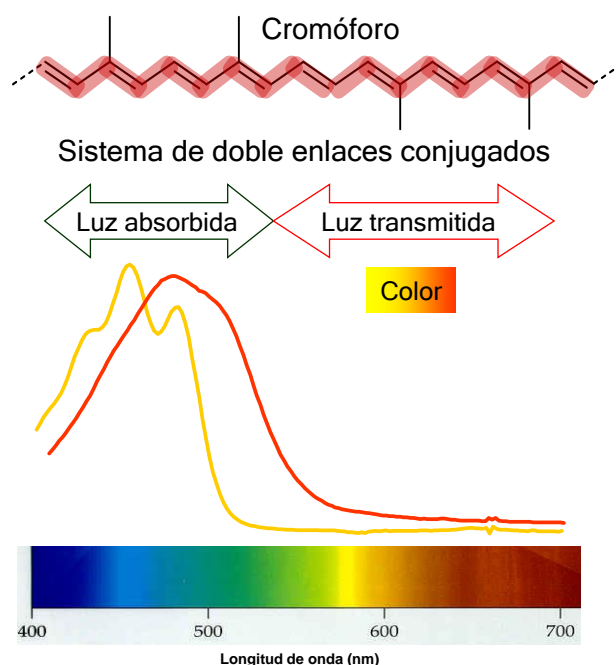


Figura 23. Relación entre estructura (cromóforo) de pigmentos carotenoides, espectro de absorción de luz visible y color.

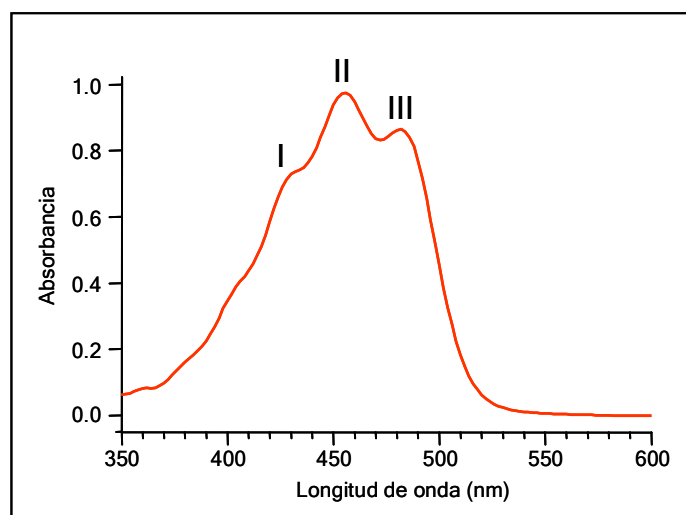


Figura 24. Espectro de absorción de luz ultravioleta-visible (UV-visible) típico de pigmentos carotenoides.

Otras modificaciones estructurales frecuentes producen, por el contrario, desplazamientos hipsocrómicos como son la sustitución del doble enlace en el anillo β por un grupo 5,6-epóxido (desplazamiento de 6 a 9 nm); conversiones en medio ácido de 5,6-epóxido a 5,8-epóxido (desplazamiento de 20 a 22 nm debido a la pérdida de un doble enlace conjugado en las posiciones 7 y 8), etc. Sin embargo la introducción de grupos hidroxilos en los anillos terminales (normalmente en los carbonos 3 y 3') y la de grupos ceto no conjugados con la cadena de polieno casi no afectan a las posiciones de los máximos de absorción (Mínguez-Mosquera *et al.*, 2002). La **Figura 25** muestra algunos ejemplos del efecto de modificaciones de la estructura carotenoides y del cromóforo sobre el espectro de absorción UV-visible. Los isómeros *cis* se caracterizan por mostrar una banda de absorción adicional alrededor de 320-360 nm, cuya intensidad depende de la localización del enlace *cis* dentro de la molécula, resultando de mayor intensidad cuando dicho enlace se ubica en el centro de la molécula, como ocurre en 15-*cis*- β -caroteno (Liaaen-Jensen y Lutnaes, 2008). La forma del espectro de absorción y las posiciones de los máximos, puede variar dependiendo de las interacciones de la molécula con los disolventes o el ambiente lipídico en el cual se encuentra disuelta (Britton, 1995). En general los disolventes con baja polaridad como hexano, éter petróleo ligero, éter dietílico, metanol o etanol tienen poco efecto sobre la posición de los máximos de absorción. La acetona así como los disolventes muy polares (como cloroformo, benceno y piridina) en cambio causan un desplazamiento batocrómico. En el caso de la acetona éste es de alrededor de 2 a 6 nm comparado con los solventes anteriores, para los muy polares el desplazamiento es relevante del orden de 10 a 25 nm. Los carotenoides acíclicos generalmente mantienen más la estructura fina que los

cíclicos (monocíclicos y bicíclicos). La mayoría de los cetocarotenoides, tales como capsanteno, donde el grupo carbonilo está conjugado con la cadena de polieno, pierden la estructura fina, y el espectro adopta una forma que consiste en una banda amplia con inflexiones muy débiles a cada lado (Goodwin, 1980). Cuando se comparan por tanto los espectros de absorción de distintos carotenoides, es importante no solo comparar las posiciones de los máximos de absorción sino además la forma y la estructura fina de tales espectros (definida por % III/II).

Existen otras propiedades espectroscópicas menos frecuentes como es la fluorescencia y la absorción de energía en la región de infrarrojo. Un ejemplo de fluorescencia lo constituye el fitoflueno, el cual fluoresce cuando se excita con una longitud de onda adecuada en torno a 350 nm. Por otro lado, la espectroscopía de infrarrojo se utiliza sobre todo para la obtención de información estructural, básicamente de grupos del tipo hidroxilo, carbonilos y aleno así como isomería *cis-trans* (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1997; 2002).

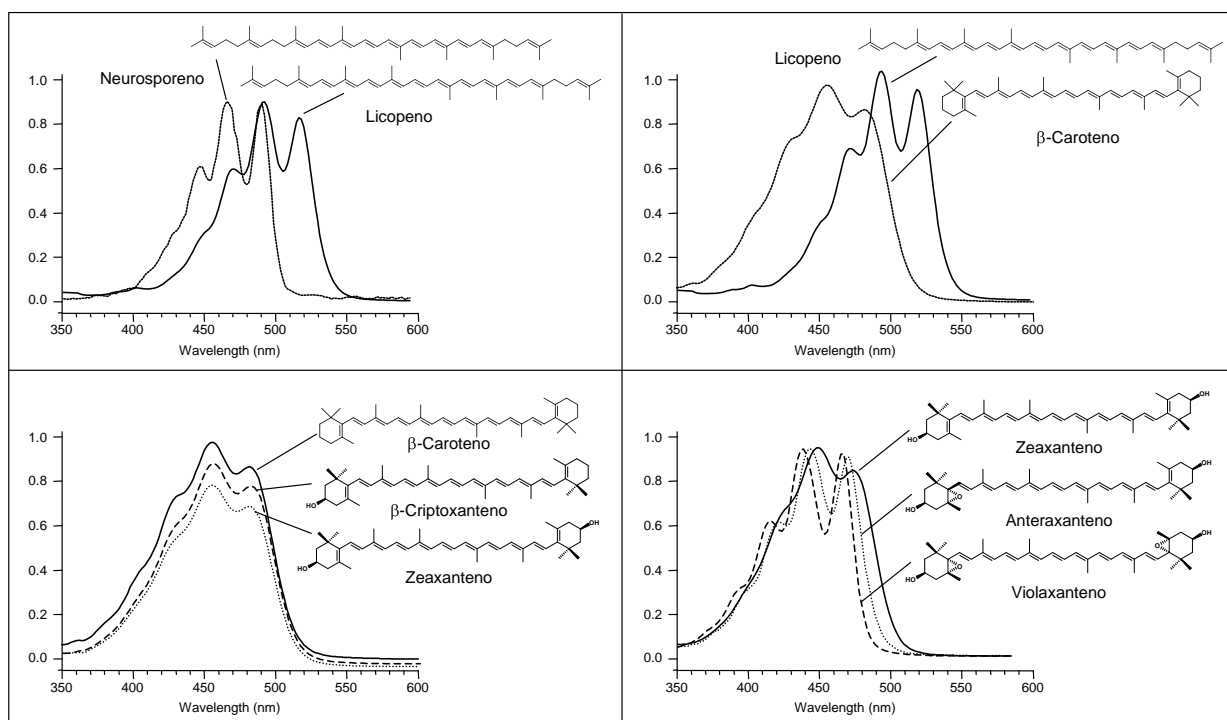


Figura 25. Efecto de diversas modificaciones estructurales de carotenoides sobre el espectro de absorción de luz ultravioleta-visible (UV-visible).

2.2.2. Presencia, distribución, localización y funciones.

Los pigmentos carotenoides están ampliamente distribuidos entre los seres vivos, tanto animales como vegetales, destacando éstos últimos por su papel, casi de forma exclusiva, de producirlos y de presentarlos en mayores concentraciones y tipos (Weedon, 1971; Britton *et al.*, 1995; Britton y Hornero-Méndez, 1997; Cuttriss *et al.*, 2011). De forma general, podemos decir que la distribución de carotenoides, entre los distintos grupos de plantas superiores, no se ajusta a un patrón único pudiendo citar ejemplos muy dispares. En vegetales verdes, la presencia de pigmentos sigue el modelo general asociado a la existencia de cloroplastos siendo β -caroteno el caroteno dominante, seguido por las xantofilas, luteína, violaxanteno y neoxanteno relevantes en el proceso fotosintético. En pequeñas cantidades se encuentran zeaxanteno, γ -caroteno, β -criptoxanteno y anteraxanteno. En el caso de los frutos, estas xantofilas se encuentran normalmente en mayor proporción. Excepcionalmente, en maíz los pigmentos dominantes son luteína y zeaxanteno, mientras que en mango (*Mangifera indica*) y caqui (*Diospyros kaki*) son β -criptoxanteno y zeaxanteno (Holden *et al.*, 1999). En cambio, en tomate (*Solanum lycopersicum*), el carotenoide mayoritario resulta ser licopeno. A veces, en ciertos frutos ocurre que algún carotenoide, además de ser mayoritario, se limita total o casi totalmente a una sola especie de plantas. Tal es el caso de capsanteno y capsorrubeno, los cuales se encuentran casi exclusivamente en los frutos maduros del género *Capsicum* (Goodwin, 1976; Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez, 1993), confiriéndoles el característico color rojo. En las semillas de cereales y oleaginosas el carotenoide mayoritario suele ser luteína (Moehs *et al.*, 2001; Hentschel *et al.*, 2002). En raíces y tubérculos como la patata (*Solanum tuberosum* L.) destaca violaxanteno y luteína (Nesterenko y Sink, 2003), mientras que en la batata (*Ipomoea batatas* L.) β -caroteno es el pigmento predominante (Hagenimana *et al.*, 1998). En el caso de las flores los niveles de carotenoides pueden llegar a ser considerables, tal es el caso de los pétalos de marigold (*Tagetes erecta* L.) que pueden llegar a contener hasta 20 veces más carotenoides (mayoritariamente ésteres de luteína) que las hojas, siendo considerada como una de las mejores fuentes naturales de luteína.

En los tejidos vegetales verdes, las xantofilas están en forma libre. Sin embargo como consecuencia de los procesos de senescencia de las hojas y maduración de muchos frutos, que coinciden con la transformación de los cloroplastos en cromoplastos, los pigmentos carotenoides experimentan una esterificación con diferentes ácidos grasos (Biswall, 1995). La esterificación no modifica las propiedades cromóforas de los carotenoides y se relaciona con la capacidad de la planta (principalmente frutos y flores)

para producir y acumular pigmentos carotenoides. La evolución del perfil de esterificación de las xantofilas en frutos de pimiento rojo ha sido utilizada como índice de maduración de los mismos (Hornero-Méndez y Mínguez-Mosquera, 2000).

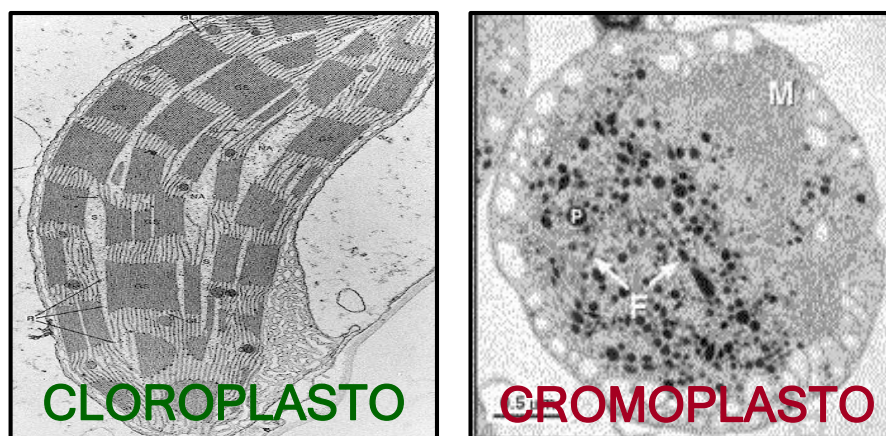


Figura 26. Fotografías al microscopio electrónico de cloroplastos y cromoplastos de frutos de pimiento verde y rojo respectivamente.

En el reino animal, los carotenoides incorporados a través de la dieta son depositados y/o almacenados en distintos tejidos como la piel, tejido adiposo, mácula, etc. Las coloraciones mediadas por pigmentos carotenoides en animales suelen estar asociadas a señales honestas relacionadas con el estado fisiológico y nutricional del animal, teniendo un papel crucial en el comportamiento sexual y éxito reproductor, especialmente en el proceso de selección de pareja, en la reducción de la disminución de la depredación y en relaciones de parasitismo (Cazzonelli, 2011). La presencia y distribución de carotenoides en mamíferos está muy limitada, encontrándose más patentes en vertebrados como aves, peces, reptiles y anfibios, y sobre todo en los invertebrados, los cuales muestran una gran diversidad de pigmentos carotenoides (Schiedt, 1998). En aves los hábitos selectivos y específicos de alimentación condicionan la asimilación de determinados carotenoides que pueden ser incorporados a las estructuras coloreadas, como plumas y tegumentos externos, bien de manera directa como en el caso del cantaxanteno en los flamencos (Amat *et al.*, 2010), o una vez metabolizados y transformados en derivados con mayor grado de oxidación, como ocurre en el plumaje rojizo de ciertos fringílicos y passeriformes en los cuales se ha demostrado la presencia de equinenona, cantaxanteno y 3-OH-equinenona, derivados del β -criptoxanteno y β -caroteno incorporados en la dieta (Blanco *et al.*, 2005; McGraw *et al.*, 2006). En los invertebrados, los carotenoides pueden asociarse íntimamente a proteínas dando lugar a un grupo de compuesto conocidos como caroteno-

proteínas. Dicha asociación supone una modificación de las características cromáticas del carotenoide, presentando coloraciones tales como el verde, azul, púrpura y gris (Zagalsky, 1985; Krawczyk y Britton, 2001). Estos complejos se encuentran normalmente localizados en el exoesqueleto, así como en huevos y ovarios, lo que sugiere su participación en el desarrollo del animal y en la reserva de nutrientes.

En los vegetales, los carotenoides se localizan y acumulan en orgánulos subcelulares especializados, llamados plastidios, existiendo prácticamente en todos los tipos de plastos diferenciados, siendo especialmente relevante la presencia de éstos en cloroplastos y cromoplastos (**Figura 26**) (Howitt y Pogson, 2006). Los cloroplastos están presentes en todos los tejidos fotosintéticamente activos, especialmente en hojas, donde prácticamente todos los carotenoides se hayan presentes en forma de complejos clorofila-carotenoide-proteína (fotosistemas PSI y PSII) a nivel de las membranas tilacoidales participando en el correcto ensamblaje de dichas estructuras (Paulsen, 1999; Pogson *et al.*, 2005). Aquí desempeñan su función básica en la naturaleza como pigmentos colectores accesorios de energía lumínica (pigmentos antena) en el proceso fotosintético, ya que debido a su espectro de absorción son capaces de capturar fotones que escapan del alcance de las clorofilas, de esta forma se recoge la luz en todo el rango de 450-570 nm (Polívka y Frank, 2010). No obstante una de las funciones con repercusión biológica más importante es su papel como antioxidantes y fotoprotectores evitando el daño oxidativo provocado por un exceso de luz en los fotosistemas (Bartley y Scolnik, 1995). La relevancia de tal función queda patente por los estudios fisiológicos con mutantes deficientes en tales mecanismos (Niyogi *et al.*, 1998; Pogson *et al.*, 1998; Lokstein *et al.*, 2002). Algunos de estos mecanismos en los que participa activamente los carotenoides son: 1) Disipación del exceso lumínico mediado por una absorción no fotoquímica: ciertas xantofilas intervienen en dicho proceso como anteraxanteno, luteína y zeaxanteno. Éste último se integra en el llamado *Ciclo de las Xantofilas*, componente clave de este tipo de mecanismos de defensa vegetal (Yamamoto *et al.*, 1962). La repercusión de las xantofilas de dicho ciclo va mas allá del propio equilibrio energético para la célula demostrando además un papel en el bienestar general del vegetal influyendo en la tolerancia a estrés abiótico, rendimiento y producción de frutos y semillas, etc (Davison *et al.*, 2002; Kulheim *et al.*, 2002). 2) Absorción de energía del estado triplete excitado de la clorofila. 3) Eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS) junto con otros antioxidantes como los tocoferoles y el ácido ascórbico (Sies y Stahl, 1995). Esta actividad antioxidante también es ejercida fuera del aparato fotosintético evitando de forma general la peroxidación lipídica y contribuyendo al mantenimiento de la fluidez y termoestabilidad de las membranas (Tardy y Havaux, 1997; Havaux y Niyogi, 1999).

Los cromoplastos presentes en flores y frutos maduros son los orgánulos que se especializan en la acumulación masiva de carotenoides. Aquí éstos actúan más bien como metabolitos secundarios, siendo además donde se puede encontrar una mayor variedad de formas estructurales (Emter *et al.*, 1990; Vishnevetsky *et al.*, 1999). En este tipo de plastidios los carotenoides se suelen acumular en estructuras ricas en lípidos, los plastoglóbulos, como ocurre por ejemplo en los frutos del género *Capsicum* y en muchas flores. En tomate, zanahoria y calabaza, se ha descrito también la presencia de cristales de carotenoides (cristaloides), principalmente carotenos, inmersos en el espacio estromático. Durante los procesos de maduración de frutos especialmente aquellos que son llamados *carotenogénicos*, como pimiento y tomate, acontecen una serie de cambios, con el paso de cloroplastos a cromoplastos, que se caracterizan por una síntesis masiva de carotenoides y por un cambio en el perfil cualitativo y cuantitativo (Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez, 1994a,b). Además, cabe destacar que en la mayoría de los casos las xantofilas cromoplásticas se encuentran esterificadas con diversos ácidos grasos, lo que aumenta su lipoficidad y facilitan su acumulación en los plastoglóbulos. La estabilidad de los pigmentos en frutos es importante para desarrollar su papel como antioxidantes (Merzlyak y Solovchenko, 2002). Aunque la función principal de los carotenoides aquí es sin duda la atracción de animales (insectos, aves y mamíferos) para que cooperen en la dispersión de las semillas y el transporte de polen y así garantizar el éxito reproductivo (Britton y Hornero-Méndez, 1997; Schemske y Bradshaw, 1999; Howitt y Pogson, 2006). Dicha atracción es ejercida no solo mediante la generación del color sino también actuando como precursores para la síntesis de compuestos volátiles, aromáticos y de señalización para tal fin (Kaiser y Kraft, 2001).

Los amiloplastos de granos de cereales y oleoplastos típicos de semillas oleaginosas como la colza y girasol, especializados en almacenar almidón y lípidos respectivamente (Kirk y Tilney-Bassett, 1978; Howitt y Pogson, 2006), pueden también contener en menor medida carotenoides. En semillas el papel antioxidante de carotenoides evita el envejecimiento de las mismas a la vez que promueven su viabilidad en procesos fisiológicos importantes como la germinación (Pinzino *et al.*, 1999; Calucci *et al.*, 2004). Los carotenoides en plantas sirven como sustratos para la síntesis de moléculas metabólicamente relevantes como son las hormonas. En este sentido destaca la síntesis en semillas y raíces del ácido abscísico (ABA), siendo el 9'-*cis*-neoxanteno su precursor, y que está involucrado en procesos de maduración y dormancia (Nambara y Marion-Poll, 2003; 2005), registrándose niveles superiores de ABA en estos tejidos con respecto a los encontrados en otras partes de la planta (King, 1976). Los niveles trazas de carotenoides registrados en otros tejidos, como aquellos que se encuentran preservados de la luz,

sugiere posibles funciones relevantes para estos pigmentos en dichas zonas. En las raíces de *Arabidopsis*, tabaco y guisante se han detectado niveles trazas de neoxanteno y violaxanteno ubicado en los leucoplastos (Parry y Horgan, 1992). La identificación de otras fitohormonas como las estrigolactonas y moléculas de señalización (apocarotenoides como mycorradicina), las cuales son importantes para el desarrollo y funciones de las raíces, ha impulsado recientemente la investigación sobre carotenoides en este tipo de tejidos (Booker *et al.*, 2004; Matusova *et al.*, 2005; Van Norman y Sieburth, 2007). Los estudios con etioplastos de plantulas que crecen en oscuridad han demostrado también funciones de los carotenoides a nivel de la fotomorfogénesis y diferenciación plastídica. Los sistemas de membranas en etioplastos que darán lugar a las lamelas de los futuros cloroplastos evidencian el papel importante de las xantofilas, como luteína y violaxanteno, en los procesos de diferenciación plastídica (Park *et al.*, 2002; Cuttriss *et al.*, 2007a).

2.2.3. Actividades biológicas y nutricionales de los carotenoides en humanos.

La actividad biológica de los carotenoides, derivada de su particular y singular estructura molecular, presenta tres aspectos diferenciables: a) el funcional (papel esencial de estas moléculas al menos en condiciones definidas, destacando la actividad como provitamina A. b) acciones (respuestas beneficiosas o adversas, fisiológicas o farmacológicas ante la administración de dichos pigmentos, no se considera esencial). c) Asociaciones (correlaciones entre los carotenoides y algún aspecto o finalidad fisiológica o médica que puede o no mostrar una relación causal) (Bendich y Olson, 1989).

En relación a los aspectos nutricionales la única función fisiológica totalmente reconocida de los carotenoides es su capacidad como precursores de la vitamina A, es decir, poseen valor de provitamina A. La relevancia de tal función queda patente ante los drásticos efectos derivados de una disminución en la incorporación de provitamina A en la dieta, por ejemplo en poblaciones infantiles de países en desarrollo (Latham, 2002; The State of the World's Children, UNICEF, www.un.org/en/mdg/summit2010). La vitamina A es requerida para la reproducción, desarrollo embrionario, diferenciación celular, inmunidad, visión etc (Von Lintig, 2010). La condición estructural para que un carotenoide presente tal actividad, es que posea al menos un anillo de tipo β - no sustituido. Esta condición reduce por tanto dicha función a pocos carotenoides por lo que podemos decir que todos los carotenoides con actividad provitamina A son antioxidantes pero no al revés. En este grupo destaca β -caroteno seguido de α -caroteno, γ -caroteno, β -apo-8'-carotenal y β -criptoxanteno.

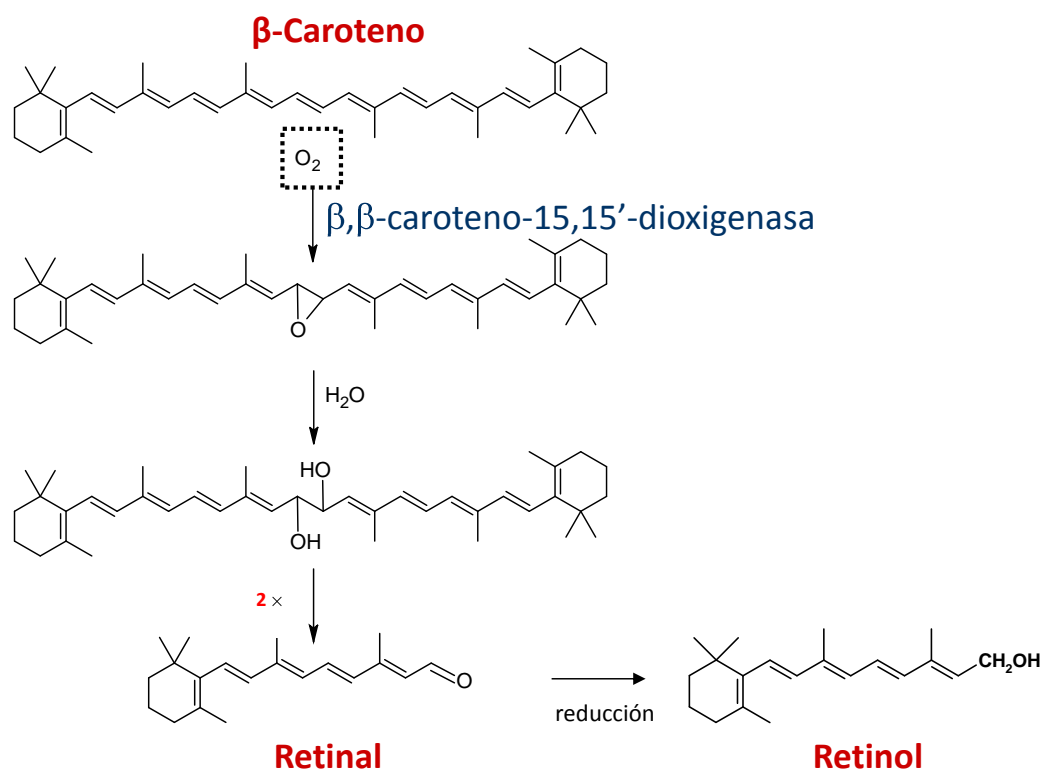


Figura 27. Mecanismo de metabolización de β-caroteno en retinol por rotura central mediada por la enzima β-caroteno-15,15'-dioxigenasa intestinal

β-Caroteno es el carotenoide que presenta mayor actividad provitamina siendo el único, a diferencia de los anteriores citados, que puede rendir dos moléculas de vitamina A o retinol, debido a su rotura simétrica central por la enzima β-caroteno-15,15'-dioxigenasa intestinal (Olson y Hayaishi, 1965) (**Figura 27**). Las investigaciones bioquímicas mas recientes sobre esta reacción apuntan que quizás dicho proceso no se encuentra restringido al intestino existiendo tejidos en los que la conversión de provitamina en vitamina A ocurre *in situ* lo que implica una mayor efectividad con respecto a los requerimientos de la misma (Lindquist y Anderson, 2002). Sin embargo, la bioconversión de provitamina A a vitamina A, no es tan efectiva, según se desprende de ensayos *in vitro* realizados en 1967 por la FAO/WHO, en los que se observó que solo un sexto del β-caroteno ingerido es metabólicamente asimilado finalmente como vitamina A. Esto supone un problema para poblaciones en vías de desarrollo en los que el acceso a alimentos enriquecidos en vitamina A o suplementos de la misma resulta difícil. En 1974 se introdujo el término *Equivalente de Retinol* (ER) para expresar el contenido en vitamina A (1 ER = 6 μg del β-caroteno + 12 μg del resto de carotenoides con valor de provitamina A).

Durante los últimos años, los estudios epidemiológicos que asocian un efecto protector de los carotenoides, totales o individualmente, frente al desarrollo de enfermedades crónicas y degenerativas ha crecido considerablemente. Esto está basado en pruebas experimentales que sugieren que estos compuestos presentan acciones muy diversas como antioxidantes, protección frente a fotosensibilización, moduladoras de la respuesta inmune, inhibidoras de mutagénesis, regulación génica, modificadores de procesos inflamatorios y de transducción de señales en y entre células, etc (Astrog, 1997; Agarwal y Rao, 2000; Fernández-García *et al.*, 2012). Esto unido a la distribución preferencial en determinados tejidos permite el planteamiento de mecanismos biológicos por los cuales estos compuestos pueden disminuir el riesgo de enfermedades crónicas (Krinsky, 2002). De entre las acciones citadas, es su papel como antioxidantes liposolubles el que se ha considerado como principal mecanismo de acción siendo investigado intensamente en los últimos 25 años (Handelman, 2001). No obstante, aunque la existencia de estudios con animales y humanos *in vitro* es diversa, demostrando exitosamente esta propiedad (Burri, 1997; Rao *et al.*, 2006), los estudios *in vivo*, más escasos que los anteriores, no han podido reproducir lo observado exactamente *in vitro* (Mayne y Parker, 1989; Albanes *et al.*, 1995; Omenn *et al.*, 1996).

Con respecto a enfermedades como el cáncer, las asociaciones inversas entre licopeno y cáncer de próstata y β -caroteno y cáncer de pulmón han sido las más estudiadas aunque los resultados obtenidos parecen estar condicionados por el estado nutricional de la población sometida a estudio y por la dosis que se les suministra (Hathcock, 1997; Albanes, 1999; Rao *et al.*, 1999; Bowen *et al.*, 2002). En el caso de las enfermedades cardiovasculares y otras relacionadas con el estrés oxidativo (Alzheimer, Parkinson, etc) los numerosos trabajos también existentes en la bibliografía muestran igualmente cierta controversia (Hennekens *et al.*, 1996; Cooper *et al.*, 1999; Voutilainen *et al.*, 2006; Polidori *et al.*, 2012). Esto hace que la tendencia sea considerar a los carotenoides más bien como biomarcadores de un estado de vida saludable asociado a una dieta equilibrada (Wright *et al.*, 2003). Así, en su conjunto, se les considera compuestos *prometedores* pero no se ha demostrado que sean reductores de esas patologías. Sin embargo, en el caso de las enfermedades oculares los resultados obtenidos son más exitosos. Luteína y zeaxanteno son casi los únicos pigmentos presentes en la retina y cristalino (Bone *et al.*, 1985; Handelman *et al.*, 1988; Landrum y Bone, 2001; Mares-Perlman *et al.*, 2002). La asociación para estos dos pigmentos en la prevención de la degeneración macular asociada a edades avanzadas (AMD; *Age Macular Degeneration*) y cataratas, se basa en su papel fotoprotector capaces de absorber luz azul, mejorar la agudeza visual y bloquear especies reactivas de oxígeno originadas en los fotorreceptores (Mares-Perlman *et al.*, 2002; Krinsky

et al., 2003). Estos mecanismos unidos a los estudios de suplementación con luteína en humanos, los cuales parecen ser más consistentes, apoyan fuertemente esta asociación. Diferentes protocolos de intervención en sujetos control han demostrado que la densidad de estos pigmentos en retina es susceptible de ser incrementada tanto por la dieta (por ejemplo consumo de espinacas, maíz y otros cereales enriquecidos) como mediante la administración de los suplementos farmacéuticos conteniendo luteína (Bone *et al.*, 2000; Olmedilla *et al.*, 2001; Beatty *et al.*, 2004; Ahmed *et al.*, 2005). La bioactividad de carotenoides también ha sido trasladada a algunos de sus apocarotenoides y metabolitos derivados siendo su uso en las industrias alimentarias, farmacológicas, nutraceuticas y nutricosméticas cada vez más extendido (Teicher *et al.*, 1999; Bouvier *et al.*, 2003; Pizza-Anunciato y Alves da Rocha-Filho, 2012; Sharoni *et al.*, 2012).

La actividad biológica de carotenoides en humanos y otros animales, depende en gran medida de la eficiencia de su absorción desde la matriz alimentaria, ya que estos solo pueden ser adquiridos a través de la dieta (Yonekura y Nagao, 2007). Esto hace que conceptos como bioaccesibilidad y biodisponibilidad de carotenoides resulten realmente importantes. La bioaccesibilidad abarca los fenómenos de digestibilidad y asimilación, mientras que la biodisponibilidad comprende además el metabolismo, transporte y distribución de los compuestos a los tejidos dianas, y finalmente el desarrollo de la actividad biológica. Los pigmentos carotenoides son moléculas de naturaleza lipofílica que deben primero solubilizarse desde la matriz alimentaria, lo cual engloba también eventos de hidrólisis enzimática, seguido de una fase de micelarización (digestibilidad). Esta última hace referencia a la incorporación dentro de micelas, agregados moleculares que transportan material liposoluble, para ser potencialmente accesibles por el epitelio intestinal. El grado de procesamiento del alimento es relevante para esta fase ya que procesos como homogenización, tratamientos térmicos, así como la adición de grasas durante dicho procesamiento incrementan la efectividad de la micelarización (Van het Hof *et al.*, 1998; Hornero-Méndez y Mínguez-Mosquera, 2007). Otro factor a tener en cuenta es la propia estructura del carotenoide, siendo la presencia de grupos hidroxilos y de ésteres características estructurales que facilitan también el proceso de micelarización. La bioaccesibilidad de carotenoides es así limitada y condicionada por diferentes factores, principalmente el grado de procesamiento del alimento y la composición de la matriz (Fernández-García *et al.*, 2012). La captación por parte del enterocito del contenido micelar, incluyendo los carotenoides, se ha supuesto que ocurre mediante un mecanismo de difusión facilitada (Parker, 1996; Parker *et al.*, 1999). Una vez que este material es internalizado por las células epiteliales del intestino (absorción o asimilación) es entonces empaquetado en lipoproteínas denominadas *quilomicrones*. Éstas son excretadas al

sistema linfático, pudiendo llegar al hígado, donde pueden ser almacenadas, o reexcretadas hacia la circulación como lipoproteínas de muy baja densidad (VLDLs). Las VLDLs una vez en circulación se transforman secuencialmente primero en lipoproteínas de baja densidad (LDLs) y finalmente en lipoproteínas de alta densidad (HDLs). La acumulación de los carotenoides en los distintos tejidos depende de receptores en los mismos para ambos tipos de lipoproteínas. Todos estos fenómenos y factores reguladores de los mismos, son obviados en la mayoría de estudios realizados al respecto en los que se evalúan la cantidad de carotenoide presente finalmente en plasma tras ingerir una dosis determinada o suplemento. Esto implica una pérdida de información relevante acerca del metabolismo carotenoide *in vivo*. Procesos experimentales *in vitro*, que simulan las condiciones fisiológicas y eventos bioquímicos que acontecen durante la digestión, son empleados de manera rutinaria para el estudio y evaluación de los factores que condicionan la biodisponibilidad de los pigmentos carotenoides a partir de los alimentos y su correlación con los efectos sobre la salud humana (revisado recientemente por Fernández-García *et al.*, 2012).

2.2.4. Bioquímica de la carotenogénesis en plantas.

Los carotenoides son compuestos isoprenoides que son sintetizados por una de las ramas de la gran ruta isoprenoide. Se encuentran por tanto biosintéticamente relacionados a otros isoprenoides como son las giberelinas, tocoferoles, clorofilas y fitoquinonas (**Figura 28**). En plantas superiores, son sintetizados en los plastos a expensas de enzimas codificadas a nivel nuclear (Cunningham y Gantt, 1998; Hirschberg, 2001). La ruta biosintética fue descifrada en los años sesenta, usando experimentos bioquímicos clásicos, mediante inhibidores específicos y mutantes bloqueados en ciertos pasos de la ruta. A principios de los años setenta, se desarrollaron experimentos en sistemas *in vitro*, que permitieron el inicio del estudio de las enzimas carotenogénicas. Desafortunadamente, las dificultades prácticas en relación a la estabilidad de dichas enzimas, sobre todo las integradas en membranas, impidieron en la mayoría de los casos purificarlas de forma activa (Bramley, 1985). Más recientemente, con el desarrollo y avance de las técnicas genéticas moleculares modernas y el uso de bacterias como sistemas modelos, se ha facilitado el aislamiento de genes, haciendo posible la complementación funcional *in vivo*, la caracterización de las correspondientes enzimas recombinantes y la creación de plantas transgénicas, lo cual ha permitido un avance sobre el conocimiento de la ruta, su regulación, así como la identificación detallada de las enzimas que participan en la carotenogénesis (Sandmann, 1994; 2001a; Hirschberg *et al.*, 1997). En la actualidad, los

principales genes que codifican las enzimas de la ruta de biosíntesis de carotenoides en plantas han sido identificados, secuenciados y sus productos caracterizados (Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012).

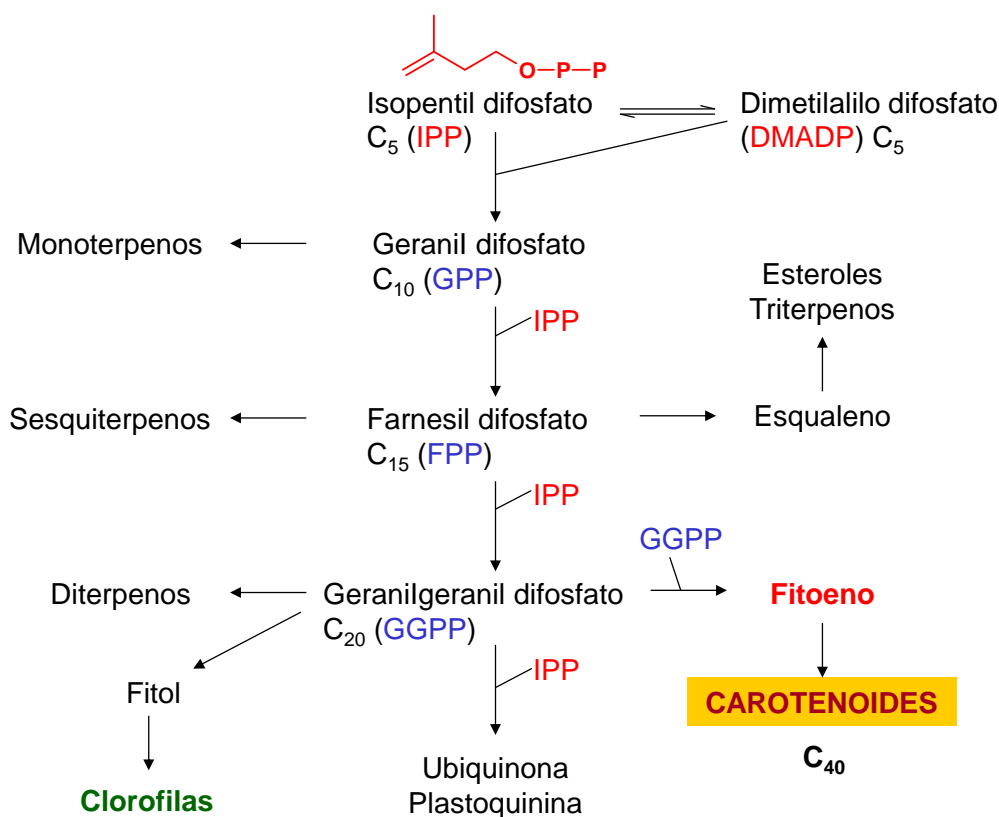


Figura 28. Esquema general de la biosíntesis de isoprenoides.

2.2.4.1. Biosíntesis de carotenoides. Genes y enzimas implicados.

La base estructural que comparten todas las moléculas isoprenoides es el compuesto isopentenil difosfato (IPP) con 5 átomos de carbono. Las plantas se caracterizan por poseer dos rutas independientes para la producción de tal precursor (Bouvier *et al.*, 2005). La producción de IPP puede ocurrir en el citosol a través de la ruta del ácido mevalónico (MVA), para generar principalmente isoprenoides mitocondriales, o en los plastidios a partir de la ruta de la deoxixilulosa-5-P o la recientemente denominada ruta MEP (metileritritol-4-P) (Lichtenthaler *et al.*, 1997; Lichtenthaler, 1999; Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002; Hunter, 2007; Rodríguez-Concepción, 2010). La mayoría de los estudios evidencian que precursores primarios de la biosíntesis de carotenoides se

generan fundamentalmente mediante la ruta MEP (Estévez *et al.*, 2001; Botella-Pavía *et al.*, 2004; Enfissi *et al.*, 2005; Carretero-Paulet *et al.*, 2006) aunque se tienen evidencia de que puede existir un pequeño aporte de precursores derivados del ácido mevalónico hacia los plastos (Nagata *et al.*, 2002; Rodríguez-Concepción *et al.*, 2004). No obstante, es su isómero alílico el dimetilalilpirofosfato (DMAPP) el sustrato inicial activado para la formación de compuestos poliisoprenoides de cadena larga como el geranilgeranilpirofosfato (GGPP). En la **Figura 29** se muestra un esquema de la biosíntesis de carotenoides en planta.

La primera reacción de la ruta MEP comprende la condensación de gliceraldehido-3-P con (hidroxietil) tiamina derivada de piruvato dando lugar a 1-deoxy-D-xilulosa-5-P (DXP) por concurso de la enzima DXP sintasa (DXS) (EC 2.2.1.7). El siguiente paso genera la síntesis de metileritritol-4-P (MEP) mediante un reordenamiento intramolecular y una reducción de DXP catalizada por la enzima DXP reductoisomerasa (DXR) (EC 1.1.1.267). Posteriormente un total de cuatro reacciones consecutivas producen, empleando MEP como precursor, 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato (HMBPP) mediante el concurso de la HMBPP reductasa (HDR) (EC 1.17.1.2) genera finalmente una mezcla de IPP y DMAPP en proporción 5:1 (Phillips *et al.*, 2008a; Rodríguez-Concepción, 2010; Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012). Todas las enzimas citadas con anterioridad son codificadas por genes nucleares y dirigidas mediante péptidos señal a los plastos (Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002; Bouvier *et al.*, 2005). A diferencia de la mayoría de éstas, que están codificadas por un único gen, las plantas parecen poseer pequeñas familias génicas que codifican para isoformas de DXR, DXS y HDR (Walter *et al.*, 2002; Paetzold *et al.*, 2010). El DMAPP no solo se produce directamente por la ruta MEP en plastos, sino también puede ser generado por isomerización por la enzima IPP isomerasa (IDI) (EC 5.3.3.2) existiendo para su producción dos genes en plantas. Ésta parece ser esencial en la producción de precursores isoprenoides en el citosol pero no tanto en plastos (Bach, 1995; Phillips *et al.*, 2008b; Joyard *et al.*, 2009) (**Figura 30**).

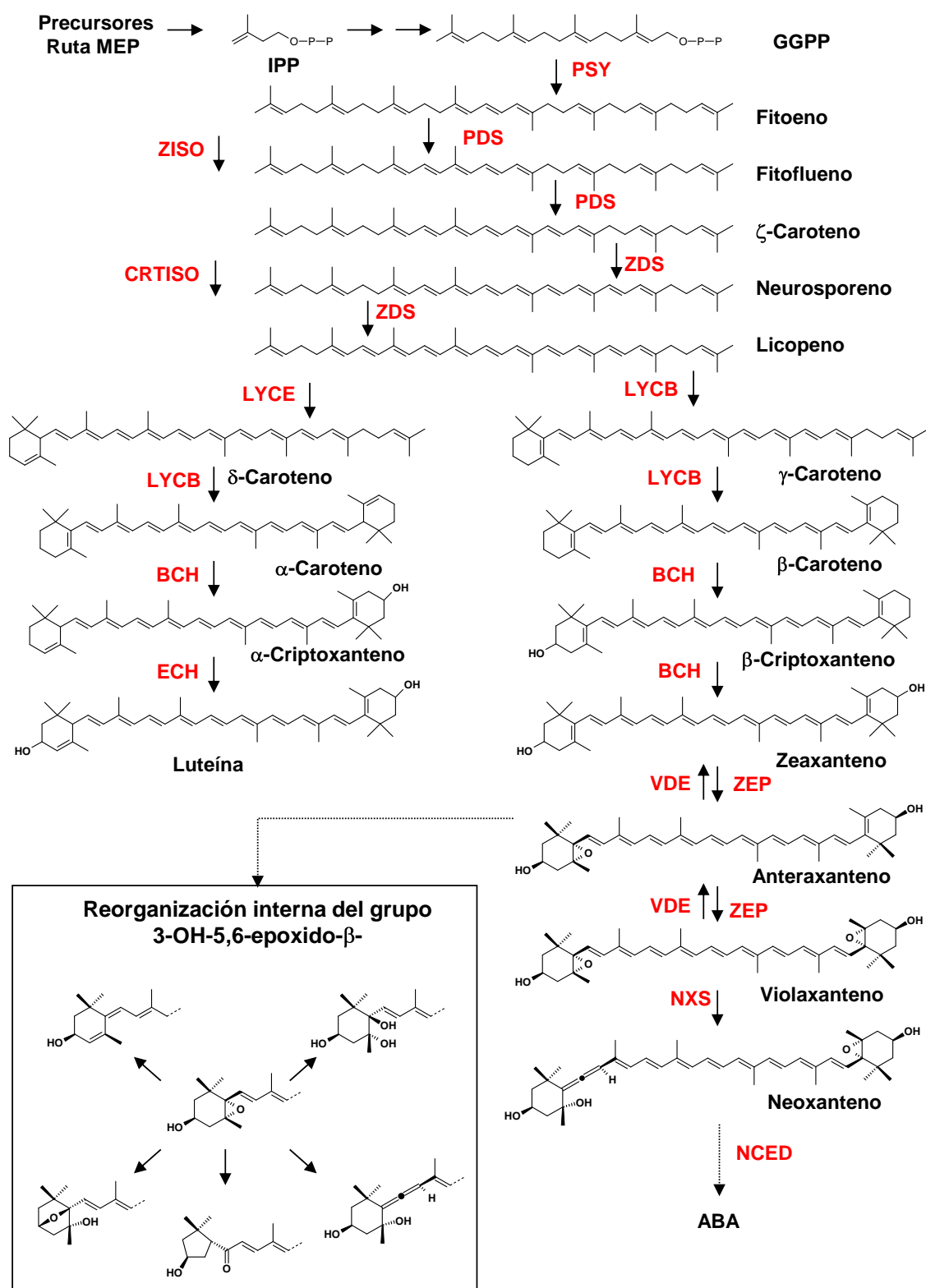


Figura 29. Esquema general de la carotenogénesis en plantas superiores. PSY, fitoeno sintasa; PDS, fitoeno desaturasa; ZDS, ζ-caroteno desaturasa; ZISO, ζ-caroteno isomerasa; CRTISO, caroteno isomerasa; LCYE, licopeno-ε-ciclasa; LYCB, licopeno-β-ciclasa; BCH, β-caroteno hidroxilasa; ECH, ε-caroteno hidroxilasa; ZEP, zeaxanteno epoxidasa; VDE, violaxanteno deepoxidasa; NXS, neoxanteno sintasa; NCED, 9-*cis*-epoxicarotenoide dioxigenasa.

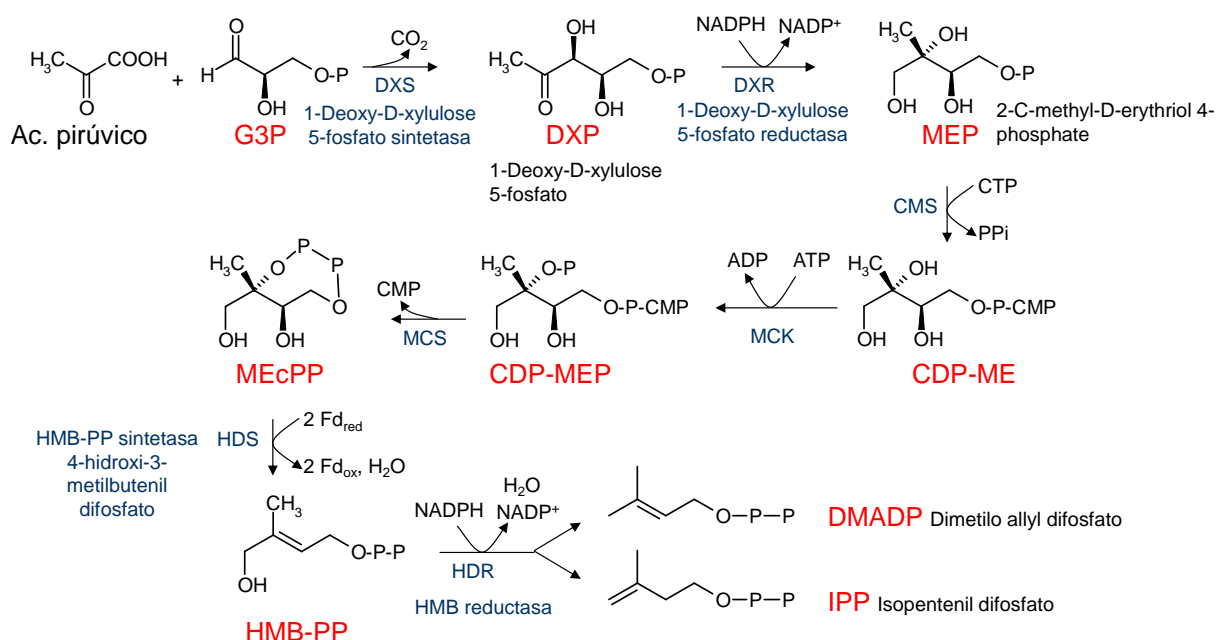


Figura 30. Ruta MEP (2-C-metil-D-eritriol-4-fosfato). Biosíntesis de los precursores IPP (isopentenil difosfato) y DMAPP (dimetil alilo difosfato) de la ruta de los isoprenoides en plantas superiores.

La adición secuencial de 3 moléculas de IPP a una de DMAPP a través de condensaciones cabeza-cola, entre los carbonos 1 y 4 de ambos compuestos, catalizado por prenil transferasas y GGPP sintasa (GGPS) (EC 2.5.1.29), da lugar a geranilgeranil pirofosfato (GGPP) (Ogura *et al.*, 1997) (**Figura 31**). Los estudios pioneros con pimiento o tomate han contribuido a la caracterización completa de dicha enzima tratándose de un homodímero soluble (Dogbo y Camara, 1987; Römer *et al.*, 1993). La presencia de varios genes que codifican para posibles GGPS en la mayoría de las plantas, sugiere el concurso de isoenzimas distintas en la producción de grupos específicos de isoprenoides (Okada *et al.*, 2000; Lange y Ghassemian, 2003).

La primera etapa específica de la síntesis de carotenoides, y considerado como uno de los puntos principales de regulación, es la condensación cola-cola de dos moléculas de geranilgeranil pirofosfato (GGPP) para dar lugar a 15-*cis*-fitoeno, considerado como el primer producto de la ruta, presentando el característico esqueleto de cuarenta átomos de carbono de los carotenoides (**Figura 32**). Dicha reacción transcurre a través de un intermediario, prefitoeno difosfato, el cual es análogo al preescualeno difosfato en la biosíntesis de esteroides.

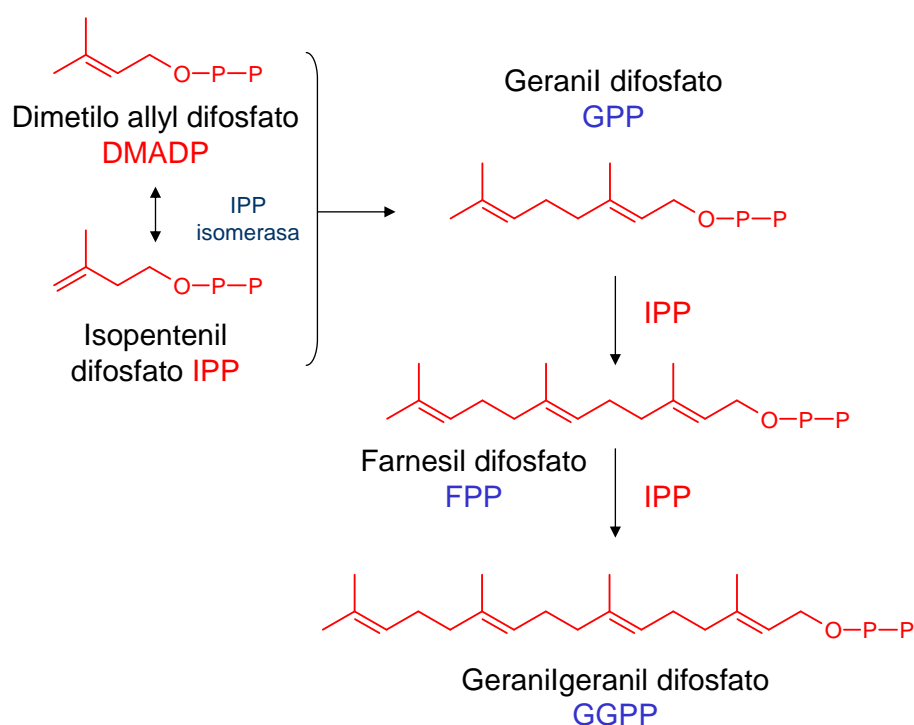


Figura 31. Síntesis de geranilgeranil difosfato (GGPP) por acción de preniltransferasas y geranilgeranil difosfato sintasa (GGPS).

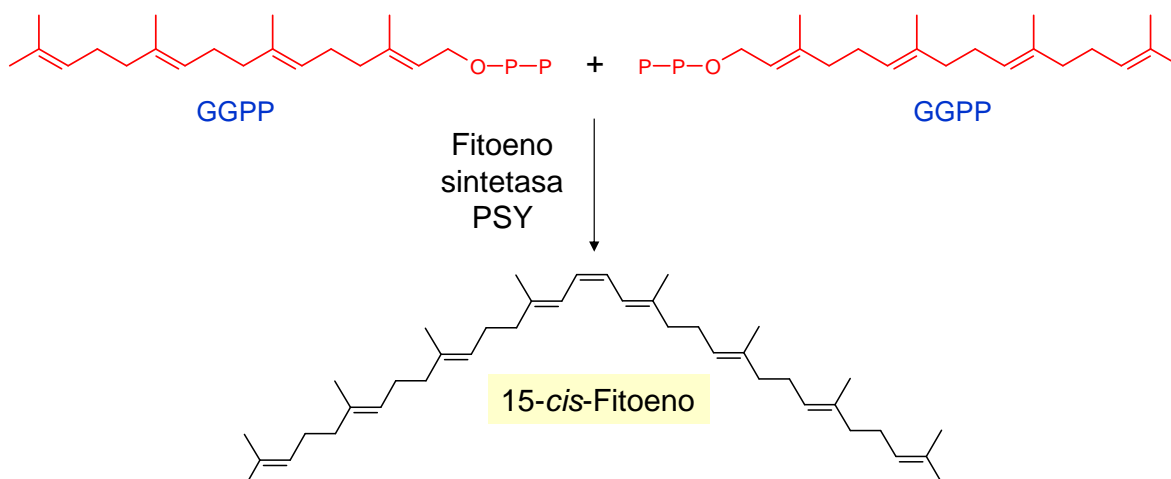


Figura 32. Síntesis de fitoeno por condensación de dos moléculas de geranilgeranil difosfato (GGPP) por acción de fitoeno sintetasa (PSY).

Fitoeno es un producto sin color, el cual generalmente no se suele acumular en los tejidos (Howitt y Pogson, 2006), aunque esta afirmación debería ser revisada al existir pocos datos cuantitativos al respecto. Esta reacción es catalizada por la enzima fitoeno sintetasa (PSY) (EC 2.5.1.32), la cual se encuentra muy conservada entre arqueas, bacterias

y organismos eucarióticos (Sandmann, 2002). Aunque en trabajos iniciales de purificación de dicha enzima realizados a partir de cromoplastos de pimientos (Dogbo *et al.*, 1988), se obtuviera una fracción soluble, modelos más recientes propuestos de la ruta en uno de los frutos más estudiados como es el tomate, apuntan a que dicha enzima podría encontrarse formando parte de un complejo con las enzimas isoprenoides IPP isomerasa y GGPP sintasa asociado pero no integrado a membranas cloroplásticas y cromoplásticas (Fraser *et al.*, 2000). Li *et al.* (2008a) detectaron mediante el empleo de anticuerpos específicos para PSY a la enzima asociada a la envoltura de membrana de amiloplastos de maíz así como Welsch *et al.* (2000) la detectaron en las membranas tilacoidales de cloroplastos maduros. En varias especies vegetales como tabaco (Busch, *et al.*, 2002), tomate (Bartley y Scolnik, 1993; Fray y Grierson, 1993; Fraser *et al.*, 1999) o cereales (Palaisa *et al.*, 2003; Gallagher *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2008b; Welsch *et al.*, 2008) se ha demostrado que fitoeno sintasa es codificada por más de un gen, observándose una expresión diferencial en los tejidos. La existencia de isoformas específicas de tejidos, y los cambios en los requerimientos bioquímicos de la enzima, como los cofactores, refleja la importancia de esta enzima y su papel regulatorio en la carotenogénesis (Fraser *et al.*, 2000).

Cuatro reacciones de desaturación consecutivas en las posiciones 11-12, 11'-12', 7-8 y 7'-8', derivan en el paso de fitoeno a licopeno, introduciendo en cada etapa un nuevo doble enlace, con la consecuente extensión del cromóforo. Esta extensión del cromóforo se traduce en que la zona de absorción máxima de luz visible se desplace hacia longitudes de onda mayores, intensificándose la tonalidad roja del producto, licopeno, con once dobles enlaces conjugados en su estructura y con máximos de absorción entre 470-500 nm (**Figuras 33 y 34**). La producción de licopeno cursa con tres intermediarios fitoflueno, ζ -caroteno y neurosporeno. Estas reacciones de desaturación están catalizadas en plantas por dos enzimas, cada una codificadas por un único gen, fitoeno desaturasa sintasa (PDS) y ζ -caroteno desaturasa (ZDS). Ambas enzimas son similares tanto estructuralmente como funcionalmente, presentando dominios de unión a FAD/NADP en el extremo amino terminal. Las investigaciones realizadas sobre la ubicación de dichas enzimas las sitúan prácticamente integradas en la membrana tilacoidal (Linden *et al.*, 1993; Lopez *et al.*, 2008a) estando la desaturación ligada a una cadena de transporte electrónico redox (Nivelstein *et al.*, 1995), lo que implica el concurso de plastoquinonas (Norris *et al.*, 1995) y una oxidasa terminal plastídica como aceptoras de electrones (Carol y Kuntz, 2001).



Figura 33. Formación de licopeno a partir de fitoeno por acción de desaturasas (fitoeno desaturasa, PDS; ζ-caroteno desaturasa, ZDS).

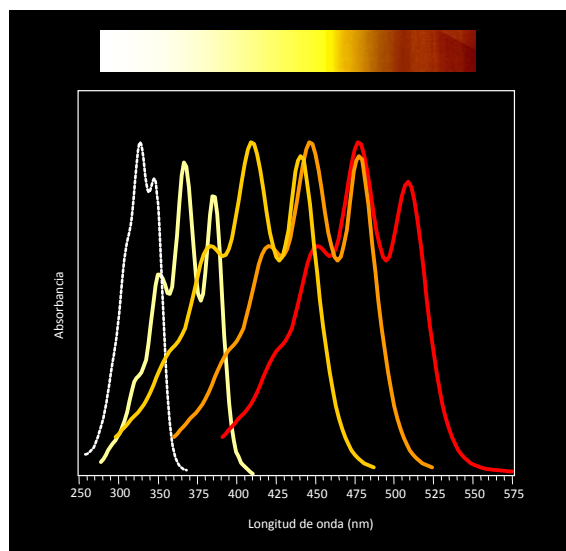
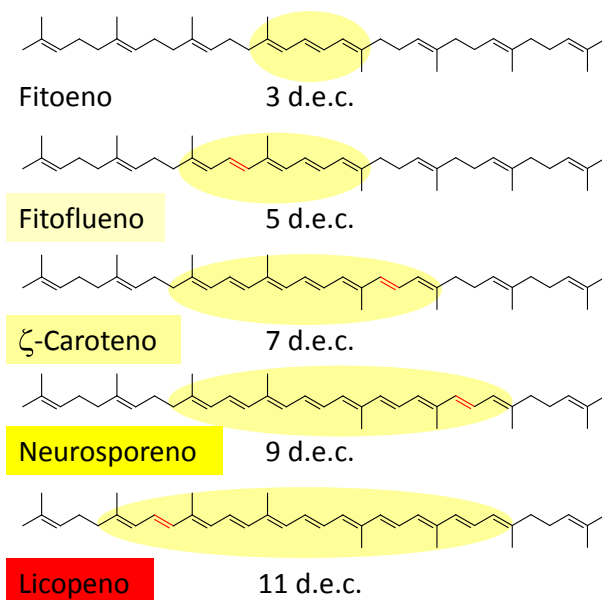


Figura 34. Efecto de la extensión del cromóforo, espectro de UV-visible y color como consecuencia de las desaturaciones sucesivas mediadas por fitoeno desaturasa (PDS) y ζ-caroteno desaturasa (ZDS). d.e.c.: dobles enlaces conjugados.

Fitoeno existe predominantemente como isómero *cis*, sin embargo, licopeno y los demás carotenoides coloreados se encuentran en la naturaleza generalmente como isómeros *trans*, por lo que se asume que existen etapas de isomerización *cis-trans* en la secuencia de desaturación. El producto de la primera desaturación es isomerizado por luz y por la recientemente identificada ζ -caroteno isomerasa (Z-ISO) aunque ésta más bien cobra protagonismo en tejidos no fotosintéticos (Li *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010). ζ -Caroteno isomerasa es codificada en la mayoría de las plantas por un único gen, aunque en el caso de *Arabidopsis* se ha descrito la existencia de transcritos alternativos. A su vez, y en paralelo a la actividad ζ -caroteno desaturasa, actúa una segunda isomerasa, denominada CRTISO, siendo al parecer su actividad reemplazada también por la luz en tejidos verdes, lo que la hace por tanto indispensable para la biosíntesis de carotenoides en tejidos como raíces o semillas en germinación. El genoma vegetal porta dos genes para la síntesis de tal enzima la cual se encuentra relacionada estructuralmente a las fitoeno desaturasas de bacterias, CRTI. Se han encontrado ortólogos de gen CRTISO en *Arabidopsis* y cianobacterias donde parecen que presentan una función similar (Sandmann, 2002; 2009; Ishikawa *et al.*, 2009). Trabajos en tomate con mutantes recesivos del locus *tangerine* han permitido una mayor caracterización de dicho polipeptido al que se ha clasificado dentro de la familia de las desaturasas de carotenos, aunque el mecanismo de isomerización sigue aún sin estar totalmente esclarecido (Isaacson *et al.*, 2002; 2004). Las últimas investigaciones apuntan a que la enzima requiere la presencia de un cofactor unido en su forma reducida, flavin adenina dinucleótido (FAD), aunque la reacción no transcurre con cambios redox netos (Yu *et al.*, 2011).

La siguiente etapa de la ruta implica la ciclación de los extremos de la molécula de licopeno, permitiendo diferenciar dos ramas, por un lado la rama β,β la cual da lugar a la formación de β -caroteno y sus derivados (β -criptoxanteno, zeaxanteno, anteraxanteno, violaxanteno, neoxanteno y otros), y por otro la rama β,ϵ la cual genera α -caroteno y sus derivados (α -criptoxanteno y luteína) (**Figura 35**). La ciclación consiste en la formación de un anillo de seis carbonos en un extremo o en ambos del precursor acíclico, y que en plantas suele ser licopeno. Se distinguen dos tipos de anillos terminales, anillo ϵ y β , los cuales se diferencian por la posición de un doble enlace dentro del anillo (ver **Figura 21**). El tipo de anillo formado dependerá de la naturaleza de la enzima ciclasa involucrada. En general, la ciclación supone una reducción de la longitud de onda de máxima absorción, alterándose sus características cromáticas puesto que el doble enlace integrado en el anillo β no participa en el cromóforo con la misma intensidad que el resto de enlaces conjugados de la cadena central, y en el caso del doble enlace del anillo ϵ la conjugación del mismo se pierde durante la ciclación (Britton, 1995). El aislamiento y complementación funcional en

E. coli ha revelado la existencia en plantas superiores de dos tipos de ciclasas, licopeno- β -ciclase (LYC- β) y licopeno- ϵ -ciclase (LYC- ϵ), que generan anillos β y ϵ , respectivamente. Licopeno- β -ciclase puede catalizar la introducción de dos anillos β de forma consecutiva dando lugar a β,β -caroteno, pero la licopeno- ϵ -ciclase solo puede incorporar un anillo ϵ en uno de los extremos para formar δ -caroteno antes de que un anillo β sea añadido al otro extremo por la β -ciclase para formar α -caroteno (β,ϵ -caroteno) (Cunningham y Gantt, 1998; Fraser y Bramley, 2004). Una excepción interesante ocurre en ciertas especies de lechuga (*Lactuca sativa*) que producen en cantidades apreciable el carotenoide lactucaxanteno (3,3'-dihidroxi- ϵ,ϵ -caroteno), el cual presenta dos anillos ϵ (Phillip y Young, 1995; Cunningham y Gantt, 2001). Debido a la existencia de heterodímeros de LYC- β en bacterias *Gram*-positivas se piensa que la enzima de plantas también actúe en forma dimérica. Cabe destacar, que las xantofilas características del pimiento, capsanteno y capsorrubeno, contienen un anillo ciclopentano inusual (anillo κ) originado por reorganización pinacólica de los grupos terminales de tipo 3-hidroxi-5,6-epoxi- de los pigmentos anteraxanteno y violaxanteno. Dicha reacción es llevada a cabo por la capsanteno-capsorrubeno sintasa (CCS) la cual presenta alta homología de secuencia con licopeno- β -ciclase (Bouvier *et al.*, 1994; Hugueney *et al.*, 1995). Todas estas ciclasas, incluida la CCS, presentan en su secuencia un motivo de unión FAD/NAD(P) en el extremo amino terminal del polipéptido maduro aunque las reacciones que median no conllevan cambio redox (Hornero-Méndez y Britton, 2002; Mialoundama *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010). Los estudios sobre estas ciclasas vegetales son diversos en la bibliografía disponiéndose de datos sobre isoformas de la enzima como las dos que existen en tomate, la LCY-B específica de tejidos verdes (Pecker *et al.*, 1996) y la CYC-B atribuida solo a tejidos cromoplasticos (Ronen *et al.*, 2000; Alquezar *et al.*, 2009). Sin embargo para el caso de otras especies vegetales como maíz y *Arabidopsis* al igual que para la LYC- ϵ se trata de polipéptidos codificados por un único gen (Lange y Ghassemian, 2003; Bai *et al.*, 2009).

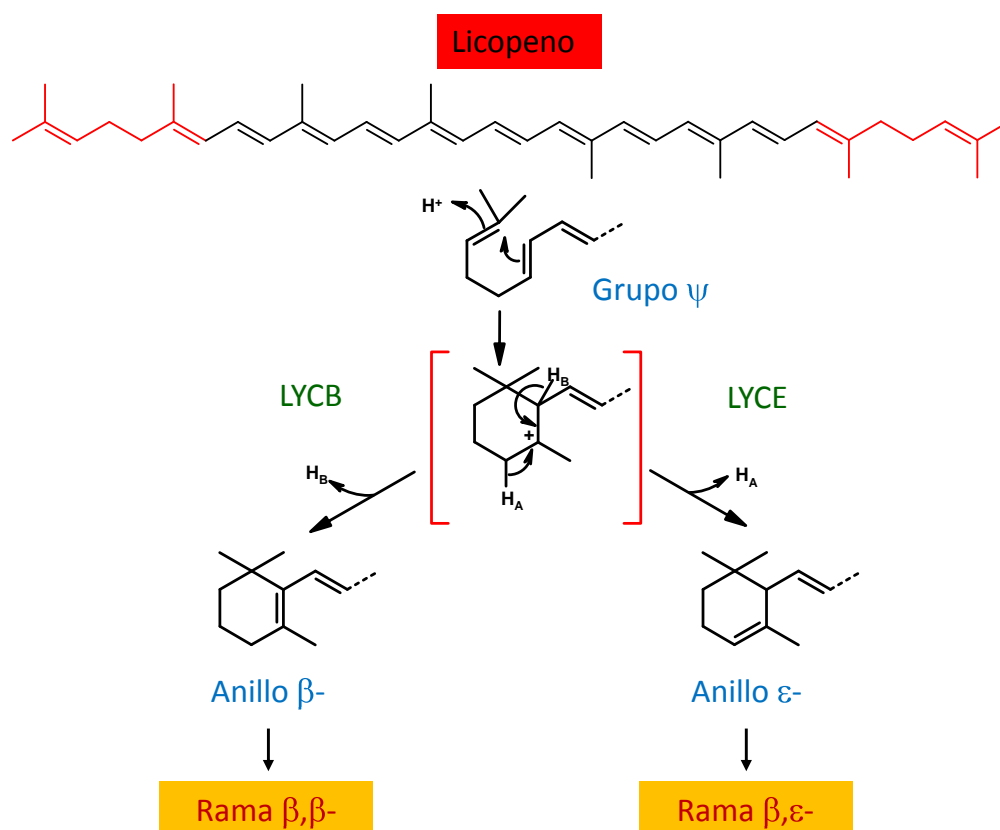


Figura 35. Ciclación de los extremos de la molécula de licopeno por acción de licopeno-β-ciclasa (LYCB) y licopeno-ε-ciclasa (LYCE). Origen de las ramas β,β y β,ε de la ruta carotenogénica.

Los últimos pasos de la ruta implican la generación de funciones oxigenadas, como hidroxilaciones, epoxidaciones, de-epoxidaciones y otras modificaciones estructurales en los extremos, incluyendo esterificación con ácidos grasos asociada a la presencia de cromoplastos, para dar lugar a las xantofilas, las cuales comprenden la mayoría de los pigmentos carotenoides presentes en plantas. Las xantofilas de plantas presentan las funciones oxigenadas en forma de grupo hidroxilo en la posición 3 y 3' o como grupo epóxido entre la posición 5,6 de un anillo β. Las hidroxilaciones en los anillos β y ε son llevadas a cabo por diferentes enzimas: β-hidrolasas y ε-hidrolasas, respectivamente. La acción de esas dos enzimas en la rama β,ε resulta en la formación de luteína (3,3'-dihidroxi-β,ε-caroteno). En la rama β,β, la β-hidrolasa actúa en dos pasos para producir β-criptoxanteno y posteriormente zeaxanteno (3,3'-dihidroxi-β,β-caroteno). Es este último tipo de hidrolasas y en particular una clase de ellas (tipo BCH, β-hidrolasas monooxigenasas dihierro), las que más se han estudiado siendo clonadas y caracterizadas desde una variedad de fuentes como *Arabidopsis*, tomate o pimiento (Sun *et al.*, 1996; Bouvier *et al.*, 1998). Se tratan de monooxigenasas dependientes de ferredoxina y requieren dos átomos de hierro no hemo para su actividad. El análisis de secuencia comparándolas con las β-



hidrolasas bacterianas revela la existencia de motivos en hélice sugiriendo una localización transmembrana para estas proteínas (Sun *et al.*, 1996). Los genes BCH están codificados en plantas por pequeñas familias génicas (Kim *et al.*, 2009) mostrando un patrón de expresión específico dependiendo del tipo de tejido del que se trate. Tanto las ϵ -hidrolasas (ECH) como la segunda clase de β -hidrolasas recientemente caracterizadas (tipo CYP97) se han identificado como integrantes de la familia de proteínas del citocromo P450. Estas enzimas llevan a cabo un mecanismo enzimático distinto al realizado por las β -hidrolasas, descritas con anterioridad, catalizando las hidroxilaciones en ambos anillos (α y β) (Tian *et al.*, 2004; Kim y Dellapenna, 2006). Este tipo de hidroxilasas pertenece al grupo más amplio de proteínas en plantas superiores las cuales median funciones muy diversas (Werck-Reichhart *et al.*, 2002). En *Arabidopsis* se han descrito tres conjuntos de familias génicas de las CYP97 la CYP97A, CYP97B y CYP97C las cuales presentan ciertas diferencias en su especificidad por sustrato (Kim *et al.*, 2009; 2010a).

Perteneciente a la misma familia que las BCH se encuentran las β -caroteno-4-oxigenasas o cetolasas. Los carotenoides con grupos cetos en la posición 4 de los anillos están ampliamente distribuidos en la naturaleza aunque raramente en plantas superiores, existiendo muy pocas especies que los presentan y en niveles relativamente bajos (Czeczuga, 1987; Goodwin, 1980; Cunningham y Gantt, 2005). En este sentido la adición de un grupo ceto en la posición 4 de uno o de ambos anillos al β -caroteno produce respectivamente equinenona y cantaxanteno. Otro ejemplo conocido de esta clase de pigmentos es astaxanteno, el cual además posee dos grupos hidroxilos en su estructura, los cuales deben ser sintetizados con posterioridad a la de los grupos cetos según se desprende de trabajos realizados con el alga *Haematococcus pluvialis* (Lotan y Hirschberg, 1995).

Luteína es el producto final de la rama β, ϵ , mientras que zeaxanteno puede ser modificado por epoxidación para producir violaxanteno, el cual se genera por la introducción de un grupo 5,6-epoxido en ambos anillos β . Esta reacción, catalizada por la zeaxanteno epoxidasa (ZEP), transcurre con el intermediario monoepoxidado, anteraxanteno. Se trata de una reacción redox que requiere de ferredoxina reducida y es reversible, de tal manera que bajo ciertas condiciones de estrés lumínico, la violaxanteno de-epoxidasa (VDE), puede catalizar la de-epoxidación de violaxanteno produciendo de nuevo zeaxanteno (Büch *et al.*, 1995; Bouvier *et al.*, 1996). Estas reacciones son conocidas bajo el nombre de *Ciclo del Violaxanteno* o *Ciclo de las Xantofilas* (Yamamoto *et al.*, 1962). Este sistema, como se indicó anteriormente, se relaciona directamente con la capacidad de zeaxanteno para actuar como protector frente al daño oxidativo ocasionado por un exceso lumínico en el aparato fotosintético (Niyogi *et al.*, 1998; Niyogi, 1999). Ambas enzimas se

encuentran separadas por las caras opuestas de la membrana tilacoidal. VDE se ubica en la cara del lumen tilacoidal y ZEP en la cara estromática (Hieber *et al.*, 2000; Yamamoto, 2006). Las secuencias aminoacídicas tanto de la ZEP como de la VDE indican que son proteínas miembros de la lipocalinas vegetales, grupo de proteínas que generalmente unen y transportan moléculas hidrofóbicas pequeñas, siendo en este caso ambas proteínas, una excepción en dicho grupo al presentar actividades enzimáticas (Hieber *et al.*, 2000). En plantas la VDE es generalmente codificada por un único gen mientras que para ZEP en algunas plantas existen pequeñas familias génicas (Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012). Este aspecto es consistente con el papel relevante de esta última enzima, como se ha visualizado del análisis de mutantes deficientes en la síntesis de ABA, implicando un papel para ésta en la regulación de la generación de los respectivos precursores de la hormona (Rock y Zeevaart, 1991; Niyogi *et al.*, 1998).

Violaxanteno origina posteriormente neoxanteno por concurso de la neoxanteno sintasa (NXS). Se trata del último carotenoide que se origina por la ruta biosintética clásica en plantas. Es codificada generalmente por un único gen el cual se ha caracterizado en patata (Al Babili *et al.*, 2000), tomate (Bouvier *et al.*, 2000) y *Arabidopsis* (North *et al.*, 2007). La caracterización genética de mutantes deficientes en ABA, como se ha indicado antes, ha permitido revelar el papel de los carotenoides, violaxanteno y neoxanteno, como precursores de esta hormona, directamente implicada en el control de la maduración de semillas y respuesta de las plantas a determinados factores de estrés, como el hídrico. La rotura de dichos carotenoides en el doble enlace 11,12 catalizada por la 9-*cis*-epoxycarotenoide-dioxigenasa (NCED), perteneciente a la familia de dioxigenasas de carotenoides (CCDs; carotenoid cleavage dioxigenasa), produce xantoxina la cual es un sustrato directo de dicha hormona (Schwartz *et al.*, 1997; Tan *et al.*, 1997).

2.2.4.2. Control de la carotenogénesis: aspectos regulatorios.

A pesar de los avances espectaculares en ingeniería metabólica aplicados a la carotenogénesis en plantas, lo cual ha ayudado a descifrar aspectos de la regulación de la misma, todavía queda mucho por hacer en relación a este aspecto y a la acumulación de carotenoides en los tejidos vegetales. Hasta la fecha, existe un cierto consenso entre los científicos admitiendo por una parte el papel relevante de la luz en dicho control y por otra la existencia de mecanismos regulatorios distintos a los que operan en tejidos fotosintéticos en flores, frutos y semillas (Cunningham, 2002; Zhu *et al.*, 2010). Dicha regulación hay que considerarla como un proceso ligado e integrado en el desarrollo y metabolismo plastidial (Bramley, 2002; Sandmann *et al.*, 2006), es decir, en definitiva a través del ciclo de la

planta (Lu y Li, 2008; Cazzonelli y Pogson, 2010) y en respuesta a estímulos medioambientales. A continuación se citan los aspectos regulatorios en relación a la biosíntesis de carotenoides (**Figura 36**). Los aspectos relativos al catabolismo y acumulación de carotenoides en los tejidos vegetales, una vez sintetizados éstos, serán citados en el siguiente apartado.

Como punto de partida las revisiones sobre regulación de la ruta de carotenogénesis describen con frecuencia los aspectos que atañen al flujo de metabolitos a través de la misma es decir los llamados *cuellos de botella*. El suministro de precursores isoprenoides es considerado el primer punto de control (Cunningham, 2002; Rodríguez-Concepción, 2010; Hannoufa y Hossain, 2012). Así, las enzimas DXS, DXR y HDR se consideran relevantes en el control del flujo de IPP y DMAPP (Estévez *et al.*, 2001; Botella-Pavía *et al.*, 2004; Carretero-Paulet, *et al.*, 2006). No obstante, la canalización de tales precursores se encuentra controlado por los niveles de PSY y su actividad (Rodríguez-Villalón *et al.*, 2009a). Esta es quizás la enzima que ejerce un mayor control dentro de la propia ruta (**Figura 36**). Numerosos experimentos de sobreexpresión del gen *psy* en diversos cultivos se traducen en un aumento en el contenido de carotenoides (Shewmaker *et al.*, 1999; Fray *et al.*, 1995; Lindgren *et al.*, 2003; Paine *et al.*, 2005; Maass *et al.*, 2009); los referentes a respuestas transcripcionales frente a factores como la luz, temperatura, fotoperiodo, ABA, desarrollo, estrés abiótico y biótico, etc; así como, según se indicó con anterioridad, la existencia de distintas isoformas manifestando una expresión diferencial en los distintos tejidos vegetales (Li *et al.*, 2008a,b; Welsch *et al.*, 2000; 2008; Arango *et al.*, 2010) permiten afianzar tal suposición. Las isomerizaciones de dobles enlaces *cis* a *trans* llevadas a cabo por las isomerasas (Z-ISO y CRTISO) parecen ser otro punto importante de regulación de la carotenogénesis. En tejidos no fotosintéticos tienen una actividad imprescindible. El papel de CRTISO resulta relevante para la producción de all-*trans*-licopeno (Park *et al.*, 2002; Matthews *et al.*, 2003). La ciclación de licopeno, y la correspondiente bifurcación de las ramas β,β y β,ϵ comprende otro cuello de botella (Pogson *et al.*, 1996; Cunningham, 2002). Las actividades relativas de las ciclasas (β y ϵ -ciclasas), se ha apuntado como un parámetro que modula la composición de β,β - y β,ϵ -carotenoides sintetizados en un tejido determinado. Esto ha sido demostrado en algunas especies como tomate (Apel y Bock, 2009), patata (Diretto *et al.*, 2006), semillas de colza (Yu *et al.*, 2008) y maíz (Bai *et al.*, 2009). Además, las hidroxilasas también cobran importancia desde el punto de vista regulatorio, siendo dianas en programas de selección vegetal destinados a la mejora nutricional del cultivo o adaptación del mismo a las condiciones ambientales (Vallabhaneni *et al.*, 2009; Quinlan *et al.*, 2012).

El primer nivel de regulación de la carotenogénesis lo conforman los mecanismos o factores que influyen en la transcripción de los genes carotenogénicos. En general los genes biosintéticos de carotenoides se expresan en alto nivel en tejidos fotosintéticos, flores y frutos siendo su expresión considerablemente más baja en tejidos preservados de la luz, raíces, semillas, etc, lo cual es consistente con los bajos niveles de pigmentos que se suelen encontrar en las dos últimas situaciones. En cultivos como cereales el control a nivel genético se complica debido a la poliploidia y a eventos de duplicación génica de sus genomas (Gallagher *et al.*, 2004). La variación alélica, el splicing alternativo, así como la expresión diferencial de isoformas génicas son reflejo de esto (Li *et al.*, 2008a; Howitt *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2009). Los procesos de desarrollo de frutos y flores así como los de fotomorfogénesis llevan consigo una actividad y alteración transcripcional importante de los genes biosintéticos (Corona *et al.*, 1996; Sandmann *et al.*, 2006). Hoy en día no cabe duda que los mecanismos de regulación transcripcional o expresión diferencial de genes son los responsables de las variaciones en el perfil de pigmentos carotenoides en diferentes especies, como por ejemplo la acumulación de licopeno durante el desarrollo del fruto del tomate (Fraser *et al.*, 1994; Ronen *et al.*, 1999; 2000), o los niveles altos de luteína en las flores de Marigold (*Tagetes erecta*) derivados de los aumentos en los transcritos de *lec* y *bch* (Moehs *et al.*, 2001). Muchos de los incrementos de transcritos de genes de esos procesos de desarrollo son inducidos por la luz (revisado por Pizarro y Stange, 2009). El ejemplo, no obstante, más conocido de la fotoestimulación de la expresión génica ocurre en la des-etiolación o la llamada fotomorfogénesis. Dicho proceso supone toda una serie de cambios en los que los genes carotenogénicos pasan de la no expresión o expresión basal a una actividad transcripcional considerable. Un mecanismo elegante para explicar dicha regulación ha sido propuesto por Toledo-Ortiz *et al.* (2010). Otras regulaciones a este nivel son las moduladas por el reloj circadiano produciéndose oscilaciones en los transcritos en función del momento del día (Facella *et al.*, 2008; Fukushima *et al.*, 2009). Otros mecanismos a este nivel son los epigenéticos. Los trabajos sobre regulación del gen CRTISO y la enzima metiladora de histonas SDG8 de autores como Cazzonelli *et al.* (2009a,b,c; 2010) son representativos.

Aunque la transcripción controlada de genes coordinada con los procesos de desarrollo (diferenciación de etioplasto a cloroplasto, de cloroplasto a cromoplasto, etc) parece ser el principal mecanismo regulatorio de la carotenogénesis no es el único (Hirschberg, 2001; Zhu *et al.*, 2010) existiendo una regulación postranscripcional. Esto hace que ciertos trabajos de correlación entre expresión génica y metabolitos generen resultados negativos (Laule *et al.*, 2003). Dentro de éstos se engloban los aspectos de almacenamiento y recambio de pigmentos, así como los que conciernen a los niveles de

actividades enzimáticas. La luz vuelve a tener un impacto importante sobre las enzimas de la ruta (**Figura 36**). La luz actúa modificando e induciendo la actividad de enzimas que dependen del estado redox (Büch *et al.*, 1995; Schürmann y Jacquot, 2000), como las integrantes del *Ciclo de las Xantofilas* (Hager y Holocher, 1994; Bratt *et al.*, 1995), y alterando los niveles de las isomerasas (Bartley *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2007) en los tejidos fotosintéticos. Otros aspectos a nivel de regulación de la actividad enzimática es la asociación de las mismas a membranas, siendo esta circunstancia especialmente necesaria para ejercer su actividad, así como para la correcta canalización y flujo de los distintos metabolitos por los complejos multienzimáticos de los que se supone que conforman la ruta carotenogénica (Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012).

Finalmente otros conjunto de mecanismos muy descritos en la bibliografía son los mecanismos de control feedback o retroinhibición por metabolitos. Existen diversos ejemplos que pueden dividirse entre los que muestran la conexión entre la ruta carotenogénica y las relacionadas a esta (MEP y ABA) (Fraser *et al.*, 2007; Welsch *et al.*, 2008; Rodríguez-Villalón *et al.*, 2009a), así como los que operan estrictamente dentro de la ruta a nivel de genes o de enzimas (Corona *et al.*, 1996; Bramley, 2002; Apel y Bock, 2009; Cazzonelli, 2011).

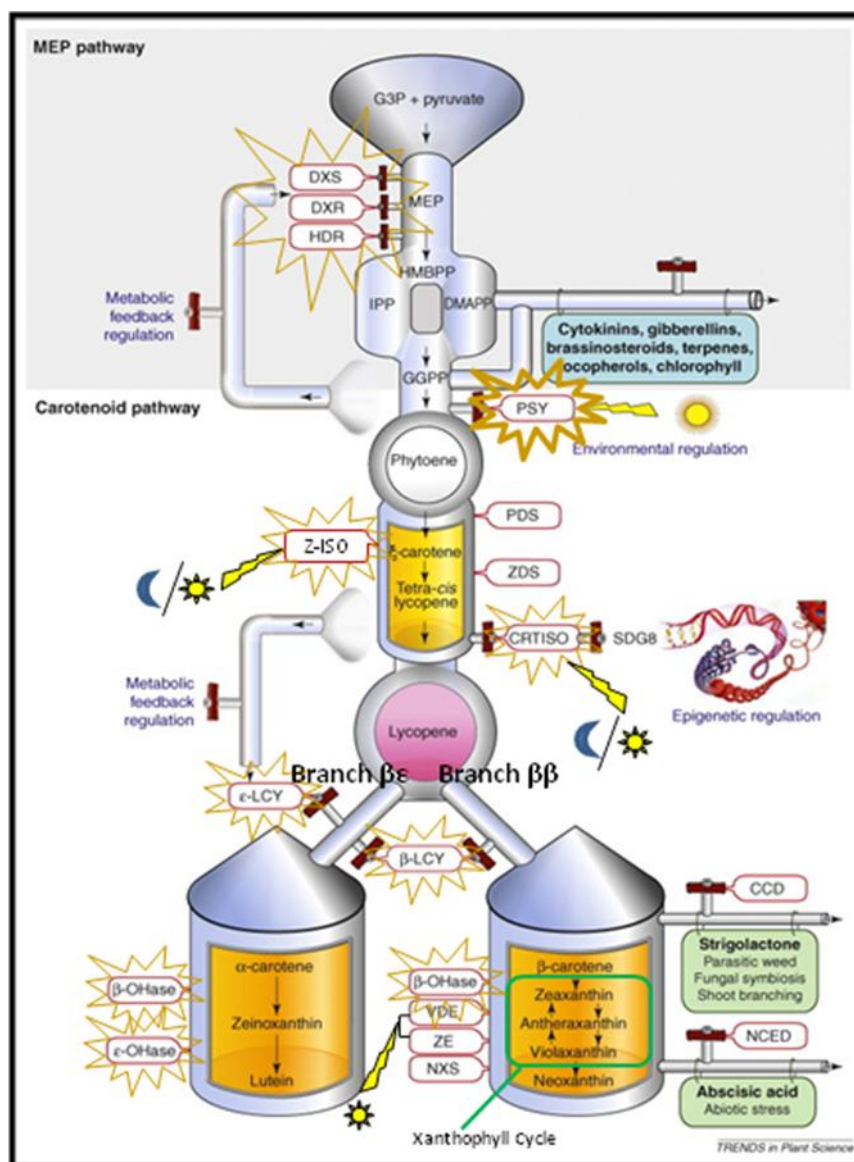


Figura 36. Regulación de la ruta carotenogénica. Tomado y adaptado de Cazonelli y Pogson, 2010. Se destacan las enzimas que intervienen en puntos de la ruta considerados *cuellos de botella*, así como las que presentan una regulación mediada por luz.

2.2.5. Catabolismo y acumulación de carotenoides en plantas.

El conocimiento acerca del metabolismo carotenóide y su regulación comprende también aspectos relativos al catabolismo y recambio, así como al almacenamiento de los pigmentos en los tejidos vegetales. Esto resulta indispensable para la justificación de la variabilidad de los niveles de carotenoides presente en cereales, al igual que en el resto de vegetales, así como para la potenciación de los mismos en nuevos cultivares (Sandmann *et al.*, 2006).

La degradación oxidativa de carotenoides puede ocurrir de forma no enzimática (foto-oxidación y termo-oxidación, principalmente) o mediado por enzimas. Estas últimas comprenden tanto las que lo hacen de forma indirecta o inespecífica como peroxidasas, polifenol oxidasas y lipoxigenasas (Matile y Martinoia, 1982; Baysal y Demirdöven, 2007), como las oxigenasas (CCD, carotenoid cleavage dioxygenase) que catalizan la rotura específica de la cadena central de la molécula de carotenoide generando apocarotenoides (Auldrige *et al.*, 2006a; Walter y Strack, 2011). En tejidos no fotosintéticos, donde la fotodegradación no es importante, el concurso de estas enzimas en el mantenimiento y regulación de los niveles de carotenoides puede ser relevante. Un ejemplo lo constituye la CCD1 en semillas de *Arabidopsis* involucrada en el control de los niveles de carotenoides (Auldrige *et al.*, 2006b). En fresa (García-Limones *et al.*, 2008), así como en el endospermo de maíz (Vallabhaneni *et al.*, 2010) se han descrito correlaciones negativas entre el nivel de expresión de CCD1 y el contenido de pigmentos carotenoides.

La capacidad de almacenamiento de pigmentos en un tejido vegetal también es considerada un mecanismo importante de regulación. Se trata de un mecanismo dinámico, que depende en gran medida del tipo y arquitectura de los plastos existentes en un momento determinado del desarrollo o del tejido considerado (Cazzonelli y Pogson, 2010). Defectos en el desarrollo plastídico y en las rutas de señalización del orgánulo llevan asociados cambios en el nivel de pigmentos y viceversa (Tzvetkova-Chevolleau *et al.*, 2007; Flores-Pérez *et al.*, 2008; Maass *et al.*, 2009). La influencia de estos factores queda patente en los trabajos de caracterización de mutantes de tomate (*hp-2* y *hp-3*) (Kolotilin *et al.*, 2007; Galpaz *et al.*, 2008), y los del gen *Or* de la coliflor (Li *et al.*, 2001) entre otros. Recientemente, Shumskaya *et al.* (2012) han descrito en maíz localizaciones diferenciales para fitoeno sintasa (PSY) dentro de un mismo tipo de plasto asociado a cambios en isoenzimas, variaciones alélicas y niveles de actividad de la misma. Lo que implica no solo una expresión diferencial de la enzima asociada a tejidos como ya previamente se ha indicado. Esto demuestra a su vez la falta de información sobre la localización en los plastos de la ruta carotenogénica al completo. Aspectos de cómo dicha ruta se ensambla, la movilidad de enzimas y de los propios carotenoides, la existencia de transportadores, etc, son aspectos todavía desconocidos que no solo atañan a la acumulación de los pigmentos en los tejidos sino al conocimiento para realizar prácticas de manipulación genética predecibles (Shumskaya y Wurtzel, 2013). Estos aspectos cobran especial relevancia en el contexto de la presente memoria, ya que sin duda deben estar condicionando los niveles de carotenoides que encontramos en el endospermo de los cereales. Existen tejidos y procesos metabólicos vegetales mas explorados en este sentido. La ubicación de la ruta en cloroplastos es bien conocida, estando asociada a la membranas

plastidiales y tilacoidales (Joyard *et al.*, 2009). Análogamente, los procesos de desarrollo de frutos y senescencia de hojas, que llevan consigo la transición de cloroplastos a cromoplastos, llevan asociados la génesis de estructuras y suborgánulos (plastoglóbulos) para el almacenamiento de pigmentos, las cuales proporcionan una mayor estabilidad a los mismos (Steinmuller y Tevini, 1985; Merzlyak y Solovchenko, 2002). Sin embargo, el conocimiento en otro tipo de plastos como los amiloplastos, es todavía bastante escaso. La organización intraorganular, así como la presencia de estructuras capaces de almacenar carotenoides son áreas que necesitan ser exploradas y con gran repercusión en cultivos como cereales, tubérculos y otros alimentos básicos (Wurtzel *et al.*, 2012).

2.2.6. Biotecnología de carotenoides: alteración del perfil carotenóide en plantas.

Existen dos estrategias principales en el campo de la Biotecnología de Plantas para alterar y aumentar el nivel de carotenoides en un determinado cultivo. Por un lado la mejora convencional de vegetales, siendo un ejemplo tritordeum el cual es uno de los cereales materia de estudio en la presente memoria, y por otro la manipulación o ingeniería genética (ingeniería metabólica). Durante los últimos años, los avances científicos en las dos corrientes han sido espectaculares. Actualmente las fronteras entre ambas (mejora vegetal-ingeniería metabólica) se han estrechado, lo que ha favorecido un aumento enriquecedor de los medios existentes para el campo de la biotecnología. Hoy en día se dispone de toda una batería de herramientas genéticas y moleculares (técnicas *ómicas*), así como de múltiples posibilidades de combinarlas, con el objetivo de obtener cultivos nutricionalmente mejores.

2.2.6.1. Estrategias para mejorar el contenido y composición de carotenoides en cultivos vegetales.

La mejora vegetal moderna ha incrementado con éxito la productividad, al conseguir un mayor rendimiento y una mejor adaptación de los cultivos a estrés biótico y abiótico siendo éste su propósito inicial. Sin embargo, los programas dirigidos a potenciar los niveles de fitoquímicos con efectos saludables, tales como carotenoides, son de desarrollo muy reciente (Welch y Graham, 2002; 2004). La mejora convencional, en este sentido, se nutre de la variabilidad natural del contenido carotenóide de los cultivos así como de la búsqueda de variantes alelicas y mutantes específicos con propiedades carotenogénicas de interés (Li *et al.*, 2001; Farré *et al.*, 2010a). Dicha variabilidad genética se organiza en locus de caracteres cuantitativos (QTLs, *Quantitative Trait Loci*). La siguiente estrategia es

desarrollar métodos de selección de alelos favorables para confeccionar líneas mejoradas del cereal que porten dicho alelos y detectar QTLs capaces de explicar gran parte de la variabilidad observada en la población. La mejora vegetal comprende cualquier forma de mejora que no incluya la introducción de nuevo material genético usando tecnología recombinante. No obstante, emplea el uso de marcadores moleculares para facilitar estrategias de selección, mutación acelerada o métodos de hibridación forzada para la introgresión de genes desde parentales distantes lo cual similarmente tampoco ocurre en la naturaleza (Bai *et al.*, 2011). Un buen referente en la bibliografía sobre la aplicación de estas herramientas y cómo han evolucionado hasta el presente se encuentra en el fruto del tomate (revisado por Foolad, 2007). La exploración del genoma de las especies vegetales y su divergencia se realiza desde tres perspectivas: la genómica comparativa empleando especies modelo, la genómica estructural y la genómica funcional (Varshney *et al.*, 2006).

La introgresión consta de dos pasos: hibridación sexual para integrar el genoma silvestre hacia el fondo genético de la especie cultivada de interés, y recombinación homóloga y/o homoeóloga para eliminar o reemplazar los alelos deletéreos y/o genes innecesarios que van asociados al locus seleccionado. Sin embargo, dicho proceso de eliminación es tedioso y costoso, por lo que este aspecto ha limitado en cierta medida el uso de especies silvestres en los programas de mejora (Feuillet *et al.*, 2007). Existen muchos factores que influyen en el éxito de estos procesos, y que no son más que un reflejo de la distancia evolutiva que separa las especies que participan.

La construcción de mapas genéticos con marcadores moleculares ha sido uno de las herramientas más utilizadas. Entre las distintas clases de marcadores destacan los basados en secuencias de repetición única o microsatélites (SSR, *simple sequence repeat*) y los de polimorfismo de un único nucleótido (SNP, *single-nucleotide polymorphism*), ambos muy abundantes en el genoma. Además se utilizan los marcadores generados a partir de regiones transcritas del genoma, los denominados *marcadores funcionales* (FM, *functional markers*), debido a que la posible función de un determinado gen puede ser deducida por tales marcadores (Varshney *et al.*, 2006). La mejora convencional puede ser acelerada en este sentido por la selección asistida por marcador (MAS, *Marker Assisted Selection*) (Ribaut y Hoisington 1998). Esto resulta especialmente útil cuando se trabaja con caracteres cuantitativos, siendo la actividad de múltiples genes los que contribuyen a un único fenotipo. Esto ha permitido finalmente mapear QTLs. Una estrategia para identificar marcadores moleculares para su posterior uso en MAS es el mapeo por asociación. Se basa en poder encontrar asociaciones no al azar entre marcadores, genes y locus de atributos cuantitativos (Flint-García *et al.*, 2003). El uso de estos marcadores también se emplea en la llamada clonación basada en mapa (MBC, *Map-based cloning*). Esta técnica

emplea los marcadores moleculares para confeccionar mapas genéticos alrededor de una región que alberga un gen de interés, para finalmente mediante mapa físico aislar el gen (Varshney *et al.*, 2006).

La mutagénesis también permite acelerar estos procesos generando nuevos alelos. La radiación con rayos X o el empleo de mutágenos químicos pueden ser los medios más habituales para tal fin. Cualquier efecto fenotípico de dichas mutaciones será observado en la siguiente generación, si es de carácter dominante, lo cual deberá ser mapeado para identificar el gen afectado. Una estrategia mejorada en este sentido es el método TILLING (*Targeting Induced Local Lesions In Genomes*). Se trata de un método que permite introducir, inicialmente mediante tratamiento con un mutágeno, mutaciones o variaciones genéticas nuevas en genes que afectan a un carácter de interés. Posteriormente se rastrea las variaciones mediante PCR diseñando primers (cebadores) específicos para amplificar un único gen de interés etiquetado de esta forma. Con este método es posible identificar variación genética a nivel de un par de bases (Slade y Knauf, 2005; Comai y Henikoff, 2006).

Así el desarrollo de poblaciones de introgresión, secuenciación de genomas y la mejora asistida por marcadores moleculares (Gupta *et al.*, 1999; Zamir, 2001; Liu *et al.*, 2003b) han supuesto los avances más notables. Sin embargo, estos procesos de selección de QTLs, aunque son agilizados por las técnicas anteriores citadas, siguen siendo lentos y restrictivos al conjunto génico ya existente en el cultivo, es decir, no permite cambios en el perfil cualitativo de pigmentos característico del vegetal.

La ventaja de la ingeniería genética incluye la habilidad de transferir genes de una manera más rápida y dirigida con la posibilidad de la introducción de material genético desde diversas plantas y especies no relacionadas tales como microorganismos (Sandmann, 2001b; Giuliano *et al.*, 2008; Fraser y Bramley, 2009). Entre los avances más recientes destacan el uso de vectores y protocolos de transformación plasmídicos cada vez más eficientes (Wurbs *et al.*, 2007). Cultivos populares en este campo como tomate, patata y arroz cuentan con diversos ejemplos en la literatura en donde se emplean diseños experimentales dirigidos a realizar ingeniería cualitativa, cuantitativa y pleiotrópica de la carotenogénesis (Ye *et al.*, 2000; Dharmapuri *et al.*, 2002; Römer *et al.*, 2002; Davuluri *et al.*, 2005; Ducreux *et al.*, 2005; Gerjets y Sandmann, 2006). La ingeniería cualitativa implica la generación de una nueva composición de pigmentos en el cultivo siendo quizás la estrategia más llamativa e implicando generalmente construcciones multigénicas. Su ejemplo más conocido y de mayor impacto mediático es el *Golden Rice* (Figura 37), el cual ha supuesto un avance importante en la mejora nutricional de alimentos básicos (Ye *et al.*,

2000; Beyer *et al.*, 2002). La ingeniería cuantitativa o aumento de carotenoides se centra en incrementar el flujo a través de la ruta ya existente en el vegetal. El incremento de precursores o la muy generalizada sobreexpresión del gen *psy* (Burkhardt *et al.*, 1997; Shewmaker *et al.*, 1999; Fraser *et al.*, 2002) suelen ser las estrategias más empleadas. Ésta última, en algunas ocasiones, deriva en un cambio además en la proporción de pigmentos que se acumulan, lo cual encierra una alteración de las actividades enzimáticas relativas de etapas más posteriores en la biosíntesis de carotenoides (Ravanello *et al.*, 2003). En ocasiones la táctica a emplear implica a una enzima, proteína reguladora o estructural de otra ruta o proceso biológico el cual no está directamente concursando en la biosíntesis de carotenoides (ingeniería pleiotrópica). Esto hace que tanto el diseño experimental como el control de los resultados sea complicado. Una de las herramientas más utilizadas por esta última es la tecnología de RNAi o silenciamiento (Davuluri *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2009).



Figura 37. Granos de arroz tradicional y de *Golden Rice 2*.

Un efecto observado con frecuencia al desarrollar estas manipulaciones de la carotenogénesis ha sido la alteración a nivel de capacidad de almacenamiento de los carotenoides, por tanto de su acumulación, provocado por la diferente naturaleza de los nuevos pigmentos o por el contenido de los mismos que se genera en el tejido vegetal modificado (Stalberg *et al.*, 2003; Jayaraj *et al.*, 2008; Maass *et al.*, 2009). Esto ha llevado al desarrollo de nuevas estrategias basadas justamente en alterar la capacidad de retención o deposición de éstos (Li y Van Eck, 2007). Dichas investigaciones se centran en trabajar con los dos genes identificados hasta el momento que median la acumulación de los pigmentos en plantas, el gen *Or* y el gen de fibrilina (Lu *et al.*, 2006; Lopez *et al.*,

2008b), así como los que codifican para las enzimas CCD implicadas en el catabolismo carotenoide (Ohmiya *et al.*, 2006).

No obstante, en la actualidad siguen existiendo obstáculos para un desarrollo y resultados completamente óptimos de dichas técnicas. Desde un punto de vista nutricional la principal desventaja de los cultivos modificados genéticamente de segunda generación reside en la falta de aceptación por el consumidor de estos nuevos alimentos en el mercado (Potrykus, 2001; Bouis *et al.*, 2003; Farré *et al.*, 2010b). La alteración de otras rutas adyacentes en el entramado metabólico isoprenoide y el conocimiento limitado de la regulación de la expresión de los genes carotenogénicos endógenos paralelos a los foráneos son los más relevantes desde una perspectiva técnica (Sandmann, 2001b). Así algunos resultados inesperados como los obtenidos por Botella-Pavía *et al.* (2004), Ralley *et al.* (2004), Enfissi *et al.* (2005), pueden ser producidos por una elección errónea del tejido, del promotor o del gen/cDNA. Los requisitos por tanto generales para un aumento eficiente en carotenoides pasa por asegurar el adecuado suministro de precursores, mantener el balance con las rutas metabólicas con las que se encuentra en conexión y que el lugar de acumulación diana sea eficiente en el almacenaje de los carotenoides generados.

2.2.6.2. Aplicaciones de la biotecnología de carotenoides en cereales.

La biotecnología como técnica de mejora vegetal aplicada al aumento del contenido de carotenoides en cereales ha sido utilizada fundamentalmente con tres especies, maíz, trigo y sorgo. La relevancia de estos cereales y su impacto en la nutrición de poblaciones desfavorecidas quedan patentes en programas de biofortificación como el de *Harvestplus* perteneciente al *Consultive Group on International Agricultural research* (CGIAR) centrado en el aumento de hierro, zinc y provitamina A de cultivos básicos (<http://www.harvestplus.org/>).

El avance en la exploración de los genomas de los principales cereales como el trigo ha sido gracias a la existencia de *modelos genómicos* como el arroz y el sorgo de los cuales se dispone la secuencia completa de sus genomas (Paterson *et al.*, 2009; Mace y Jordan, 2011). Gran parte de la investigación se ha basado en primer lugar en estudiar la viabilidad del rasgo susceptible a ser mejorado de forma convencional, es decir la variabilidad para el contenido carotenoide en una población dada. Así como la heredabilidad del mismo que ha sido apuntada como alta (Santra *et al.*, 2005; Clarke *et al.*, 2006). Los genomas de maíz, sorgo y trigo han demostrado presentar una diversidad genética importante para este carácter, como así lo refleja la existencia de germoplasmas

de elite de dichas especies (Chander *et al.*, 2008b; Ibrahim y Juvik, 2009). Hasta la actualidad el estudio se ha centrado en la detección de QTLs, existiendo numerosos trabajos que describen la identificación de dichos locus y su relación con la variación fenotípica en el contenido carotenoide del endospermo de cereales (Wong *et al.*, 2004; Pozniak *et al.*, 2007; Chander *et al.*, 2008b; Patil *et al.*, 2008; Salas-Fernández *et al.*, 2008). La investigación a este nivel va más allá de la justificación del contenido carotenoide global identificándose QTLs específicos para carotenoides específicos como luteína y β -caroteno. Salas-Fernández *et al.* (2008) detectan en sorgo cinco QTLs sobre los cromosomas 1, 2, y 10 para β -caroteno. Howitt *et al.* (2009) identifican tres QTLs para el contenido de luteína sobre los cromosomas 3B, 5B y 7A de trigo duro. Así como más recientemente Blanco *et al.* (2011) obtienen en el mismo cereal QTLs tanto para β - como α -caroteno en los cromosomas 2A, 3B y 7A. En trigo los QTLs más determinantes para el contenido en pigmentos han sido repetidas veces mapeados sobre los cromosomas 7A y 7B, tanto en trigo duro como harinero. Los genes que codifican para PSY1 generalmente cosegregan con esos QTLs. Las variaciones alélicas de esos genes son numerosas y la aparición continua de nuevos alelos resulta muy probable. Esto demuestra un alto nivel de polimorfismo genético así como mucha genómica por explorar (Ravel *et al.*, 2013).

Como se introdujo con anterioridad, una de las grandes estrategias en mejora vegetal es la búsqueda de nuevas fuentes de variación en especies relacionadas. En este caso particular podemos citar *Lophopyrum ponticum* (Zhang *et al.*, 2005) y *H. chilense* (Rodríguez-Suárez *et al.*, 2011b; Rodríguez-Suárez y Atienza, 2012). *H. chilense*, cuyos pequeños granos se caracterizan por presentar un nivel de carotenoides alto, presenta al menos dos *locis* para el contenido de pigmentos ubicados en los cromosomas 2H^{ch} y 7H^{ch} (Álvarez *et al.*, 1998, 1999b; Atienza *et al.*, 2004, 2008). El conocimiento de la localización cromosómica de estos genes fue primero estudiado por Álvarez *et al.* (1998) usando líneas de adición de *H. chilense* en trigo. Estos autores localizaron genes responsables del nivel de pigmentos (medido como YPC) en *H. chilense* sobre el cromosoma 7 y mapearon este rasgo sobre el brazo α de dicho cromosoma. Sin embargo la posibilidad de la interacción entre genes de *H. chilense* y los del trigo, en tritordeum que podrían llevar a ocultar la existencia de otros genes responsables de la regulación de pigmentos, propició la búsqueda de nuevos locus en el genoma de esa especie. Posteriormente, mediante la construcción del primer mapa genético de *H. chilense* (Hernández *et al.*, 2001b), derivó en la identificación de un nuevo QTL sobre el cromosoma 2 denominado *carot 1* (Atienza *et al.*, 2004). Actualmente la generación de mapas de mayor cobertura para dicha especie con estos fines están ya disponibles (Rodríguez-Suárez *et al.*, 2012) lo que genera una mayor probabilidad de encontrar regiones genómicas de interés en *H. chilense*. Estos datos

constituyen los primeros pasos hacia el desarrollo de un programa de MAS para el contenido de carotenoides en *Tritordeum*, lo cual es interesante para la transferencia de genes determinantes de un mayor contenido en carotenoides, desde *Tritordeum* a líneas de trigo sometidas a programas de mejora. De este modo, el anfiploide *Tritordeum* también se convertiría en una especie útil para la mejora de cereales actuando como especie puente entre la cebada y el trigo (Álvarez *et al.*, 1999b; Martín *et al.*, 1999; Atienza *et al.*, 2005, 2007a, 2007c).

Las líneas de *Tritordeum*, independientemente del nivel de ploidía, muestran niveles de carotenoides bastantes más altos que sus parentales de trigo. Debido a eso una de las líneas de investigación más extendida ha sido estudiar la variación genética de este rasgo en tritordeum y su relación con el nivel de pigmentos de ambas especies parentales, *H. chilense* y trigo. De estos estudios se desprende que aunque el genoma H^{ch} es claramente responsable de dicho nivel de pigmentos en tritordeum, pueden existir interacciones entre los sistemas genéticos de ambas especies parentales que no deben obviarse (Álvarez *et al.*, 1999b).

La utilidad de la ingeniería metabólica para mejorar la nutrición humana alcanza sus mejores propósitos en el campo de los alimentos básicos (*Staple Foods*) donde, no cabe duda que, el impacto en poblaciones de bajos recursos puede ser máximo. La generación de nuevos cultivos con la etiqueta *Golden* como *Golden Potato* o *Golden Canola* son cada vez más numerosos sumándose al bien conocido *Golden Rice* (Beyer, 2010; Bai *et al.*, 2011). En cereales es justamente el éxito de éste último el que ha llevado a la manipulación de otras especies. La intensa investigación desde los primeros intentos realizados con dicho cultivo por Burkhardt *et al.* (1997) hasta los más recientes con la generación del *Golden Rice 2* (Paine *et al.*, 2005) ha proporcionado ideas para tal fin. La expresión del gen *y1* de maíz en el endospermo de trigos harineros hexaploides constituye un ejemplo (Cong *et al.*, 2009). El maíz también cuenta con algunos ensayos al respecto. La utilización mejorada del promotor γ -zein (Marzábal *et al.*, 1998), altamente específico para la expresión en tejido endospermico (*super γ -zein*) se tradujo en un aumento de carotenoides totales de hasta 34 veces con una acumulación preferencial en el mismo de β -caroteno (Aluru *et al.*, 2008). Una estrategia más compleja fue ideada por Zhu *et al.* (2008) mediante la generación de toda una batería de plantas transgénicas de maíz que resultaron de las múltiples combinaciones posibles fruto de una transformación multigénica. Más recientemente el aumento simultáneo en el contenido en tres vitaminas, implicando la manipulación así de tres rutas metabólicas distintas (Naqvi *et al.*, 2009), coloca al maíz como un cultivo prometedor para potenciar en carotenoides provitamina A, mostrando menos restricciones que otros como arroz o trigo (Wurtzel *et al.*, 2012). Las investigaciones

más recientes con *Golden Rice* se centran ahora en el estudio de la estabilidad y transferencia de los transgenes para la obtención de cultivares de arroz con un mayor rendimiento mediante introgresión y otras técnicas de mejora (Datta *et al.*, 2006; 2007). Otros granos minoritarios como sorgo y mijo, pero también con un gran impacto en poblaciones de bajos recursos como la africana, están adaptándose cada vez más a estas técnicas haciéndose un hueco en la biofortificación mediada por manipulación genética (O'Kennedy *et al.*, 2006; www.grandchallenges.org/ImproveNutrition/Challenges/NutrientRichPlants/Pages/Sorghum).

2.3. Carotenoides en cereales.

2.3.1. Composición y distribución de carotenoides.

Los cereales y derivados son buenos ejemplos de alimentos que contienen una mezcla compleja de antioxidantes de diversos orígenes como fenoles (los más mayoritarios), folatos, vitamina E, ácido fólico, minerales y carotenoides entre los minoritarios (McKevith, 2004). En general el contenido en antioxidantes en cereales se concentra principalmente en las fracciones de salvado y germen, y la mayoría de ellos son más abundantes en la capa de aleurona. Así mismo el contenido en fitoquímicos está sujeto a variaciones importantes atendiendo a factores como el tipo de cereal, la variedad, lugar y condiciones de cultivo, estadio de desarrollo, condiciones de almacenamiento o procesado (Liu, 2007; Fardet *et al.*, 2008), cobrando especial relevancia las interacciones genotipo-ambiente (Hidalgo *et al.*, 2009a; Van Hung y Hatcher, 2011; Lv *et al.*, 2013). El perfil carotenoide en cereales está conformado en su mayoría por xantofilas, siendo luteína la más abundante, seguida por zeaxanteno y β -criptoxanteno, siendo además común encontrar carotenos como α - y β -caroteno, de forma minoritaria. El embrión es el que presenta la mayor concentración de carotenoides, pero éste solo representa entre el 3-5% del total siendo por el contrario, la contribución del endospermo, en torno al 80-85% del grano de cereal, el que más influye en la contenido total de carotenoides del grano. La distribución de este perfil carotenoide parece variar entre genotipos de un mismo tipo de cereal (Siebenhandl *et al.*, 2007) y dentro del mismo grano, concentrándose α -, β -caroteno y zeaxanteno en el germen y salvado mientras que luteína se detecta distribuida más homogéneamente a lo largo del mismo (Konopka *et al.*, 2004; Panfili *et al.*, 2004; Borrelli *et al.*, 2008; Ndolo y Beta, 2013). La bibliografía en relación al análisis de carotenoides en cereales, sobre todo para algunos como cebada, centeno y mijo es bastante escasa (Choi *et al.*, 2007; Kandlakunta *et al.*, 2008; Mamatha *et al.*, 2011).

Entre todos los cereales, y aun siendo el nivel de carotenoides en estos alimentos relativamente bajo en comparación con frutas o verduras, podemos citar al maíz de genotipo amarillo como el que presenta mayores niveles de estos fitoquímicos. La mayoría de los cultivares presentan zeaxanteno como pigmento mayoritario portando también cantidades considerables de β -criptoxanteno, y de α - y β -caroteno en menor medida (Panfili *et al.*, 2004). De los estudios cuantitativos realizados con este cereal se desprende que existe una gran variabilidad en el contenido carotenoides entre variedades (Quackenbush *et al.*, 1961; Kurilich y Juvik, 1999; Egesel *et al.*, 2003; Berardo *et al.*, 2004; 2009), lo que evidencia que el genotipo es el factor más determinante en dicha variabilidad (Menkir y Maziya-Dixon, 2004; Ibrahim y Juvik, 2009) seguido de las condiciones de almacenamiento y procesado (Scott y Eldridge, 2005; de Oliveira y Rodríguez-Amaya, 2007; Burt *et al.*, 2010).

Para el caso del arroz son las variedades pigmentadas obviamente las que resultan de interés desde el punto de vista cuantitativo. El grano de arroz convencional concentra su contenido en carotenoides prácticamente en el salvado (Fardet *et al.*, 2008; Sellappan *et al.*, 2009) por lo que las habituales prácticas de molienda y pulido del grano implica una reducción significativa de estos componentes (Tan *et al.*, 2005). Al igual que para casi todos los cereales, luteína resulta ser el pigmento mayoritario (Belefant-Miller y Grace, 2010), estando acompañada de zeaxanteno y β -caroteno en cultivares de pigmentación oscura o negra (Frei y Becker, 2005; Lamberts y Delcour, 2008; Nakornriab *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2010b). En algunas variedades de arroces negros tailandeses la concentración de β -caroteno en el salvado (33.58-41.48 $\mu\text{g/g}$) puede ser considerable (Nakornriab *et al.*, 2008). Recientemente las semillas de mijo han destacado también por su contenido en β -caroteno (5.3-6.3 $\mu\text{g/g}$), siendo el pigmento mayoritario en este cereal (Li y Beta, 2012). Con respecto al sorgo, aunque ha sido considerado como uno de los cereales con menor contenido de carotenoides, los trabajos pioneros de Blessin *et al.* (1958) y Suryanarayana *et al.* (1968) sobre variedades de endospermo amarillo, así como los recientes estudios de Kean *et al.* (2007, 2011), ofrecen mejores perspectivas a este cereal. Estos autores encontraron un contenido carotenoides entre 0.112-0.315 mg/kg, que aunque sigue siendo bastante más bajo que el aporte del maíz amarillo no debe ser despreciado. La avena también es citada en la literatura como uno de los cereales con más bajo nivel de carotenoides, indicándose por Panfili *et al.* (2004) unos niveles de luteína y carotenos (α y β -caroteno) del orden de 0.20 mg/kg y 0.01 mg/kg, respectivamente.

El trigo, junto con el maíz y el arroz, son los cereales más populares debido a su consumo generalizado. Este aspecto se ve más que constatado en la literatura, existiendo

interés, desde aproximadamente los años 70 hasta la actualidad, en estudiar su perfil antioxidante y contenido en fitoquímicos saludables, así como la distribución inter e intravarietal de los mismos (Lier y Lacroix, 1974; Velioglu *et al.*, 1998; Adom *et al.*, 2003; 2005; Zhou *et al.*, 2004b; Zhou y Yu, 2004a; Okarter *et al.*, 2010; Di Silvestro *et al.*, 2012). Al igual que para el caso del maíz, la variabilidad genética encontrada entre genotipos para el contenido carotenóide, ofrece un margen interesante de funcionamiento para la mejora en este campo (Leenhardt *et al.*, 2006a; Digesù *et al.*, 2009). Los trigos de genoma diploide, en particular el trigo Einkorn, están considerados como los que aportan unos niveles más altos, aproximadamente del orden de 2 a 4 veces con respecto a los demás trigos. El trigo Einkorn a su vez también destaca por su actividad antioxidante (Lavelli *et al.*, 2009). Seguidos de éstos destacan los trigos tetraploides, siendo en este caso los trigos duros los que presentan mayor contenido carotenóide (en torno a 5-6 µg/g), aunque podemos mencionar otros como el trigo ancestral Emmer con niveles similares (aproximadamente de 3-5 µg/g). Por último, los trigos de genoma hexaploides están considerados los de menor aporte prestándose atención casi exclusivamente al trigo harinero común siendo como media en torno a 2 µg/g (Hidalgo *et al.*, 2006; Abdel-Aal *et al.*, 2007; Hidalgo y Brandolini, 2008a; Serpen *et al.*, 2008). Estos datos cuantitativos no son más que un reflejo de la selección realizada por el hombre. A su vez las especies cultivadas presentan mayor contenido que las variedades silvestres, fruto de la actividad de los programas de mejora y selección dirigida hacia variedades con un mayor contenido carotenóide (Digesù *et al.*, 2009). Un ejemplo lo constituye el trigo duro, el cual ha sido ampliamente analizado debido a que el color de la sémola o el llamado *yellow pigment content* (YPC) está considerado como uno de los principales criterios de calidad de los productos derivados de él como la pasta (Hentschel *et al.*, 2002; Humphries *et al.*, 2004; Fratianni *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2011). La situación inversa ocurre para el trigo harinero, como se ha indicado antes, el cual presenta los niveles más bajos de carotenoides debido a la presión ejercida por el hombre hacia la preferencia de harinas cada vez más blancas para la posterior generación de derivados por exigencias del mercado.

Con respecto a tritordeum, la mayoría de las estimaciones del contenido carotenóide realizadas hasta la fecha, no proporcionan información de la composición individualizada del perfil de pigmentos, debido a las metodologías analíticas tradicionalmente empleadas en cereales. Los trabajos recientes de Atienza *et al.* (2007a), así como los presentados en la presente memoria (Mellado-Ortega y Hornero-Méndez, 2012), han contribuido sustancialmente a la caracterización y cuantificación de pigmentos en tritordeum por vez primera. Este aspecto será desarrollado con mayor detalle en la sección de *Resultados y discusión* de la presente tesis doctoral. En cualquier caso, mediante las estimaciones como

YPC se observaron en líneas de tritordeum unos niveles en carotenoides del orden de cinco a seis veces superior (en el rango de 11-13 $\mu\text{g/g}$) con respecto a trigo harinero (2 $\mu\text{g/g}$) y de dos a tres veces superior con respecto a trigo duro (5-6 $\mu\text{g/g}$) (Álvarez *et al.*, 1995; Martín *et al.*, 1999), siendo comparable a los niveles que caracterizan al trigo Einkorn. En un estudio mas completo evaluándose un total de 35 líneas primarias de tritordeum junto con sus respectivos parentales, 27 accesiones de *H. chilense* y 19 cultivares de trigo duro, los niveles medios de carotenos ($\mu\text{g/g}$ de β -caroteno, YPC) para el anfiploide seguían siendo del orden de dos veces superior al parental de trigo pero tres veces inferior a la media de *H. chilense* (Álvarez *et al.*, 1999b). Actualmente, dentro de las líneas avanzadas de tritordeum, HT621 se encuentra registrada como línea de élite de germoplasma destacando por su alto contenido en pigmentos carotenoides (19 μg equivalentes de β -caroteno/g, YPC) (Ballesteros *et al.*, 2005). El análisis detallado y comparado de perfil y composición carotenoides de líneas avanzadas de tritordeum y variedades selectas de trigo duro es uno de los principales objetivos del presente estudio.

2.3.2. Análisis de carotenoides en cereales.

Al igual que para cualquier muestra a analizar, independientemente de su origen, el análisis de carotenoides en cereales se componen de tres pasos básicos, preparación de la muestra, extracción y separación o aislamiento de los pigmentos. Lo que implica a su vez métodos de detección y cuantificación de los mismos. Los procedimientos de trabajo se ajustarán a los objetivos que se vaya a realizar, técnicas que se apliquen y sobre todo al tipo de muestra (cereal y derivados). Debido a las propiedades físico-químicas de estas moléculas, pueden existir problemas en cualquiera de los pasos analíticos, como oxidación del analito, extracción incompleta o isomerización *cis/trans*. Estos aspectos han sido ampliamente tratados en revisiones en la literatura (Britton, 1985; Tee y Lim, 1991; Mínguez-Mosquera *et al.*, 1997; Rodríguez-Amaya, 2001; Mínguez-Mosquera *et al.*, 2002). La oxidación de la molécula, potenciada por la luz o el calor, suele ser el principal hándicap a tener en cuenta. Esto ha llevado a tomar precauciones como empleo de antioxidantes (ácido ascórbico, butilhidroxitolueno (BHT), etc.), el uso de atmosferas inertes (Ar o N₂) para el almacenamiento, la adición de bicarbonato sódico o carbonato cálcico para neutralizar los ácidos presentes en el medio, etc. Las limitaciones del análisis a veces son atribuidas a otros factores como por ejemplo la obtención de patrones con fines identificativos (Oliver y Palou, 2000). En cereales otro problema generalizado ha sido la incompleta extracción de los pigmentos por ejemplo a partir de granos de trigo duro o productos derivados como sémolas y pastas (Burkhardt y Böhm, 2007). Esto genera

estimaciones erróneas siendo esta temática un punto importante que debe ser optimizado (Hentschel *et al.*, 2002). Debido a que el color de los productos derivados del trigo duro ha sido un criterio de calidad importante, la determinación de pigmentos desde esta matriz en cualquiera de sus modalidades ha sido la más estudiada en cereales. La bibliografía registra dos procedimientos o metodologías principales. Métodos destructivos, siendo éstos como se introdujo al inicio los que centran este apartado, implicando la extracción química y determinación espectrofotométrica (métodos oficiales o métodos alternativos); así como los no destructivos, constituyendo básicamente mediciones colorimétricas mediante reflectancia, NIRS, CIE (L^* , a^* , b^*) (Berardo *et al.*, 2004; 2009; Humphries *et al.*, 2004).

Como prerrequisito del análisis, en algunos casos, es necesario el tratamiento de la muestra antes de la propia extracción con el objetivo de facilitar la liberación de pigmentos desde la matriz y hacer la muestra más homogénea. Generalmente en cereales este proceso implica la molienda reduciéndose la muestra a harina. Esta operación puede ser por vía seca o húmeda en cuyo caso molienda y extracción se hacen simultáneamente. En este último caso el extracto obtenido debe ser filtrado o centrifugado y posteriormente dicho residuo recogido para ser sometido a otras extracciones hasta el agotamiento del color.

Dentro de los métodos oficiales de determinación de pigmentos aplicables a cereales, existen dos muy conocidos para la extracción y valoración del llamado *yellow pigment content* (YPC) los cuales se encuentra registrados para trigo duro (sémolas y harinas), método 152 de la ICC (*International Association for Cereal Science and Technology*) y el 14-50 perteneciente al AACCC (*American Association of Cereal Chemists*). Ambos métodos se basan en la extracción de los pigmentos mediante 1-butanol saturado en agua seguido de cuantificación espectrofotométrica expresando la concentración de pigmentos mediante equivalentes de β -caroteno. En los últimos años las deficiencias en ambos métodos son cada vez más patentes llevando a los analistas a utilizarlos con fines comparativos y complementarios a otros más potentes y fiables (Fratianni *et al.*, 2005; Beleggia *et al.*, 2010) y a desarrollar modificaciones en los mismos. Mediciones a otras longitudes de ondas, estimación del cálculo en base luteína como pigmento principal (Abdel-Aal *et al.*, 2007; Burkhardt y Böhm, 2007), así como la reducción del material necesario para el análisis (micro escala) (Santra *et al.*, 2003; Beleggia *et al.*, 2010; Fu *et al.*, 2013) se encuentran entre las modificaciones más frecuentes. La elección del solvente es un aspecto de suma importancia para la extracción de antioxidantes en alimentos (Taungbodhitham *et al.*, 1998). Zhou y Yu (2004b) observaron una influencia importante en el solvente empleado, al estimar la actividad antioxidante de fracciones de salvado de trigo, obteniendo los mejores resultados con acetona al 50%. Esto ha llevado a algunos autores a comparar distintos solventes como alternativa al propuesto en los métodos oficiales

(Hidalgo *et al.*, 2006; Abdel-Aal *et al.*, 2007). Los solventes alternativos más utilizados son acetona, etanol, metanol, tetrahidrofurano, mezclas de éstos e incluso mezclas con agua (acetona-agua, 80:20). Un procedimiento muy generalizado en el análisis de carotenoides es la eliminación de materia grasa, siendo la saponificación el método más comúnmente empleado. Esto en algunos casos puede resultar beneficioso simplificando el análisis cromatográfico y eliminando sustancias interferentes con pruebas identificativas (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1997). Pero a la vez implica una pérdida de información estructural relevante ya que elimina los ésteres de xantofilas con ácidos grasos, además de la fracción clorofílica en caso de estar presente. Uno de los métodos más utilizados es la saponificación usando KOH-metanol normalmente entre el 10-30% (p/v) a temperatura ambiente (Menkir y Maziya-Dixon, 2004; Konopka *et al.*, 2006; Kean *et al.*, 2007; 2008). El empleo de un porcentaje al 80% a 85°C fue utilizado por Egesel *et al.* (2003), Xu *et al.* (2010) y Hu y Xu (2011) para el análisis de carotenoides en granos de maíz reduciendo así el tratamiento a 10 minutos, aunque estas condiciones tan agresivas pueden, sin lugar a dudas, desencadenar pérdidas significativas de pigmentos por degradación oxidativa, derivando en una inevitable infravaloración del contenido carotenoide.

En general, el extracto que se obtiene después de extraer y saponificar (según el caso), consta de una mezcla de pigmentos de distinta polaridad, carotenos y xantofilas. La evolución de las técnicas de separación de pigmentos ha experimentado una profunda transición desde el empleo de sistemas de reparto de fases hasta las técnicas cromatográficas (clásicas y modernas), promovido especialmente por el desarrollo continuado de diferentes materiales de adsorción (Rizzolo y Polesello, 1992; Oliver y Palou, 2000). El análisis en cereales hoy en día se realiza principalmente mediante HPLC, facilitando la composición cualitativa y cuantitativa de carotenoides individuales de una muestra, en contraposición de la información que puede ser obtenida por los métodos colorimétricos o los métodos espectrofotométricos oficiales, ya citados. Las técnicas cromatográficas clásicas, profundamente utilizadas en el pasado, como la cromatografía en columna (CC) o en capa fina (TLC) (Quackenbush *et al.*, 1961; Blessin, 1962; Lepage y Sims, 1968) han sido completamente sustituidas por el HPLC para la determinación de carotenoides en cereales. TLC permanece en uso en la actualidad de forma complementaria, siendo esencial para pruebas identificativas y necesaria para la obtención de estándares.

Con respecto a la aplicación de métodos de HPLC para el análisis de carotenoides en cereales, la técnica más habitual suele ser la fase reversa usando como fases estacionarias octadecilsilano (C₁₈) o la mejorada triacontilsilano (C₃₀) aumentando la interacción entre fase sólida y el analito (revisado por Sander *et al.*, 2000). Esto ha

supuesto un avance en el poder de resolución cromatográfico facilitando la identificación de isómeros geométricos (O'Neil y Schwartz, 1992). La fase C₃₀ ha sido utilizada ampliamente con éxito para la separación de pigmentos en cereales como maíz (Moros *et al.*, 2002; Egesel *et al.*, 2003; Kean *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2010; Hu y Xu, 2011), cebada (Siebenhandl *et al.*, 2007), trigo (Konopka *et al.*, 2006; Abdel-Aal *et al.*, 2007; Digesù *et al.*, 2009; Werner y Böhm, 2011) y arroz (Nakornriab *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2010b). Sin embargo, Kean *et al.* (2007) emplearon una columna polimérica C₁₈ para el aislamiento de carotenoides en granos de sorgo consiguiéndolo en 30 minutos aunque obtuvieron en cambio una resolución parcial de los isómeros *cis*. Leenhardt *et al.* (2006a) utilizaron la misma columna para establecer una correlación entre las determinaciones de pigmentos espectrofotométricas y la obtenida por HPLC en trigos harineros; la misma comparación más exhaustiva fue realizada por Luterotti *et al.* (2013) recientemente con harinas y sémolas de maíz. Recientemente también, se ha desarrollado un método rápido y sensible para la medida de carotenoides en trigo duro mediante el empleo de la técnica UHPLC (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*) (Van Hung y Hatcher, 2011). Di Silvestro *et al.* (2012) se suman al empleo de columna C₁₈ para la valoración de pigmentos en un estudio amplio con variedades diversas de trigos. Con respecto a la fase móvil la mezcla de solventes polares como metanol, acetonitrilo, acetona, metil tertbutil éter, y agua se encuentran entre los más utilizados Hentschel *et al.*, 2002; Moros *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2005; Abdel-Aal *et al.*, 2007; Atienza *et al.*, 2007b; Belefant-Miller *et al.*, 2010; Lachman *et al.*, 2013). Como alternativa a la fase reversa, la cromatografía en fase normal de sílice también ha sido tradicionalmente aplicada en cereales (Weber, 1987; Panfili *et al.*, 2004). Los gradientes de elución durante la separación también son preferidos aunque sistemas de elución isocrático se emplean en algunas ocasiones (Serpén *et al.*, 2008). La efectividad de la separación depende en gran medida del tamaño de partícula, siendo las más empleadas de 3 y 5 µm, siendo este un campo en desarrollo con las aparición de las técnicas de UHPLC y la utilización de partículas inferiores a 1.7 µm, así como las novedosas fases de núcleo rígido de 2.6 µm que posibilitan obtener resoluciones y tiempos de análisis similares a los de UPLC en sistemas cromatográficos convencionales.

La detección es llevada a cabo principalmente con un detector espectrofotométrico de ultravioleta-visible. Los de longitud de onda variable o detectores de *diode array* son los más empleados debido a la posibilidad de obtener el espectro de absorción completo (revisado por Huber y George, 1994; Mínguez-Mosquera *et al.*, 1997). Para la cuantificación de las señales de HPLC, se pueden emplear tanto estándares internos como externos bien de origen comercial o aislados de fuentes naturales. La combinación acoplada de HPLC con un detector de espectrometría de masas (MS), supuso una mejora en la identificación

de tales moléculas, aportando una mayor especificidad y resolución (Van Breemen, 1997). La técnica en tándem de HPLC-DAD-MS ha sido empleado con éxito para el análisis de carotenoides en cereales empleando como técnicas de ionización el electrospray (ESI) o la ionización química a presión atmosférica (APCI) (Zhou *et al.*, 2004b; Moore *et al.*, 2005; Abdel-Aal *et al.*, 2007; Atienza *et al.*, 2007b). En el presente trabajo de investigación se mostrará el alcance y potencia de estas técnicas para la caracterización por vez primera de los regioisómeros de ésteres de luteína en cereales.

2.3.3. Tecnología de cereales y su influencia sobre el contenido carotenoide en granos y productos derivados.

Las condiciones de conservación y almacenamiento, así como las distintas técnicas de procesado, implican por lo general cambios en los componentes de los alimentos, por lo que su estudio es relevante en el campo de tecnología de alimentos por ser determinantes de muchos atributos de calidad (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1997; Nicoli *et al.*, 1999; Rodríguez-Amaya, 2003; Kalt, 2005). En relación a estos aspectos se debe de diferenciar por un lado el efecto del propio procesado del alimento, las variables medioambientales tales como oxígeno, temperatura, luz y humedad bajo las que se desarrolla el tratamiento, y las interacciones con otras moléculas antioxidantes y pro-oxidantes presentes (Lindley, 1998; Nicoli *et al.*, 1999). En el caso de carotenoides presentes en cereales el almacenamiento de los granos y productos derivados se traducen generalmente en una disminución del contenido en pigmentos, siendo directamente proporcional a la duración del proceso y al incremento e intensidad de otras variables relevantes como la temperatura o la presencia de procesos degradativos (Cristobal, 1965; Weber, 1987). Resulta llamativo que la bibliografía concerniente a este aspecto sea especialmente escasa ya que los cereales se caracterizan por experimentar periodos de almacenamiento prolongados como parte de su tratamiento tecnológico industrial. Por otro lado, para procesos como el descascarillado, molienda, secado, horneado, fermentación, etc, resulta complicado definir una pauta generalizada en el comportamiento o afectación de los pigmentos, ya que la bibliografía cuenta con resultados tanto positivos, negativos como indiferentes sobre el nivel de carotenoides presentes. En general estos procesos afectarán a la estructura interna de la matriz del cereal y/o producto derivado, con implicaciones importantes en relación a la accesibilidad y posterior biodisponibilidad de los carotenoides (Kean *et al.*, 2008; 2011; Maiani *et al.*, 2009).

La velocidad a la que acontecen estos cambios ha sido materia de estudio generalizada en tecnología de alimentos. La bibliografía sobre cinética de carotenoides en

alimentos es tan numerosa como a la vez dispar, siendo por tanto una temática en la que existen resultados a menudo contradictorios (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1997). La abundancia de tales trabajos refleja la importancia de los pigmentos carotenoides no solo desde el punto de vista nutricional, sino también desde el tecnológico para la industria alimentaria, siendo de interés no solo cuantificar las pérdidas sino analizar las condiciones que proporcionen una mayor estabilidad y retención de los mismos. El color es considerado uno de los principales criterios de aceptación de los productos por los consumidores. En la industria harino-panadera y en el sector de pastas/sémolas este criterio también es relevante, según se indicó con anterioridad, para el caso de los productos derivados de trigo duro. Las investigaciones al respecto intentan por tanto reproducir las condiciones de procesado y almacenamiento de los alimentos, incluidos los cereales, al objeto de poder comparar entre los distintos tratamientos industriales, y monitorizar la incidencia individual o conjunta de factores como actividad del agua, temperatura, luz, oxígeno, pH y otras sustancias prooxidantes o antioxidantes (Mínguez-Mosquera y Gandul-Rojas, 1994; Tsimidou, 1997; Selim *et al.*, 2000; Fish y Davis, 2003; Ouchi *et al.*, 2010; Saxena *et al.*, 2012), permitiendo estimar la vida útil de los alimentos. La mayoría de los estudios han sido realizados en alimentos vegetales como zanahorias (Wagner y Warthesen, 1995; Koca *et al.*, 2007; Lemmens *et al.*, 2010), tomate (Sharma y Le Maguer, 1996; Tonon *et al.*, 2007), pimiento y derivados (Carbonell *et al.*, 1986), patata (Bechoff *et al.*, 2010), o zumos de cítricos y otros (Dhuique-Mayer *et al.*, 2007; Zepka *et al.*, 2009) siendo habitual que los autores describan una reacción de degradación que cursa según una cinética de orden 0 ó 1. Sin embargo, la bibliografía es bastante limitada para el caso particular de cereales, debido probablemente al bajo nivel de pigmentos que éstos presentan, existiendo muy pocos estudios en los que se realice una valoración cinética detallada (Guzmán-Tello y Cheftel, 1990; Hidalgo y Brandolini, 2008b). No obstante, aunque no se cuantifiquen dichas alteraciones, en la mayoría de los trabajos con cereales, los autores coinciden en indicar que los cambios acontecen generalmente más rápidamente al inicio de los procesos de almacenamiento y conforme progresan van siendo amortiguada la velocidad de las pérdidas que se registran (Quackenbush, 1963; Burt *et al.*, 2010).

2.3.3.1. Estabilidad de carotenoides durante el almacenamiento poscosecha de granos y harinas.

Los procesos de almacenamiento conllevan pérdidas de carotenoides impulsadas en su mayoría por procesos de oxidación, tanto enzimática como no enzimática. El contenido de oxígeno del medio está considerado como el factor más relevante en relación

a la estabilidad de los carotenoides (Britton y Khachik, 2009). Otras modificaciones de las moléculas muy conocidas de estos procesos son las isomerizaciones geométricas (*cis-trans*) promovidas por la temperatura, y que se caracterizan por generar alteraciones de la actividad biológica de los pigmentos más que pérdidas netas. Los mecanismos de ambos procesos han sido descritos en la literatura especializada (El-Agamey y Mcgarvey, 2008; Liaaen-Jensen y Lutnaes, 2008). En los almacenamientos de granos de cereales la oxidación viene mediada prácticamente por el oxígeno sin embargo en los de productos derivados como harinas, entre otros, la alteración de la matriz conlleva no solo procesos oxidativos directos sino mediados por enzimas al facilitar el contacto entre éstas y los carotenoides (Doblado-Maldonado *et al.*, 2012).

Como se introdujo con anterioridad los resultados obtenidos en estos experimentos depende básicamente de las condiciones empleadas siendo las variables más evaluadas la duración del tratamiento y la temperatura. La bibliografía cuanta con ejemplos en los que se observan claramente los efectos de estas dos variables, lo que permite ver la repercusión de éstas en la estabilidad de los carotenoides presentes (Arya y Parihar, 1981; Farrington *et al.*, 1981; Pinzino, 1999; Calucci *et al.*, 2004; Nghia *et al.*, 2006; Hidalgo y Brandolini, 2008b). En ocasiones, los diseños experimentales cubren, además del propio almacenamiento, una práctica de procesado habitual en tecnología de cereales. Esto amplía el estudio pero por otro lado, en cierta medida, dificulta la interpretación de los resultados que se obtienen. Por ejemplo, Belefant-Miller y Grace (2010) evalúan el comportamiento de carotenoides durante un almacenamiento prolongado de arroz previamente descascarillado. Una de las prácticas habituales en cereales antes de su almacenamiento es el secado de los granos. La reducción de la humedad evita el deterioro por mohos, plagas, ácaros, etc, así como una posible germinación prematura del grano (Chelkowski, 1991; Jood y Kapoor, 1994). Algunos autores como Burt *et al.* (2010) no obtienen una reducción significativa del contenido en pigmentos cuando comparan un secado a alta temperatura (90°C) con uno a temperatura ambiente a igualdad en las condiciones de almacenamiento de granos de maíz. Otros autores, por el contrario, si encuentran diferencias importantes en dicho contenido atribuidas no solo a la temperatura aplicada durante el secado de los granos sino también a la duración del mismo (Quackenbush, 1963). Aunque, al margen de esta controversia, las condiciones más óptimas para la conservación de los cereales, y en particular para preservar los carotenoides en ellos presentes, se alcanzan siempre empleando un método exhaustivo de retirada de agua (deshidratación) y almacenamiento a temperaturas bajas. Los estudios sobre humedad relativa en almacenamientos de granos a veces también describen aspectos relacionados con el metabolismo de carotenoides los cuales tienen implicaciones

importantes para la retención y estabilidad de los mismos (Kaneko *et al.*, 1995; Kaneko y Oyanagi, 1995). Tratamientos térmicos antes de almacenamiento también han sido realizados con harinas para evaluar la generación de radicales libres y su impacto en los antioxidantes (Andersen *et al.*, 2011) así como la posible inactivación de enzimas degradativas de éstos (Rodríguez-Amaya, 1997).

2.3.3.2. Efecto del procesado de cereales sobre el contenido carotenoide.

Las distintas técnicas de procesado, como se ha introducido con anterioridad, no cabe duda que modulan el contenido en carotenoides que finalmente vaya a estar presente en los productos derivados de los cereales debido, entre otros factores, a la distribución desigual de los pigmentos en las distintas partes del grano (Konopka *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2004a). Esto ha llevado a la modificación así como desarrollo de nuevas técnicas de tratamiento con el objetivo de preservar o potenciar el contenido en carotenoides y otros fitonutrientes de relevancia nutricional. Las técnicas emergentes de procesado se suman así a la mejora convencional y la manipulación genética para la obtención de cultivos de granos biofortificados (Hemery *et al.*, 2007; Fardet, 2010). Los cereales son generalmente procesados de dos maneras: fraccionamiento en seco seguido de cocinado (a diferentes condiciones de temperatura, contenido de agua y presión) para producir productos como pasta, galletas, cereales de desayuno, etc, y fermentación para por ejemplo la generación de ciertas bebidas alcohólicas. Los productos más populares como el pan y la bollería combinan ambos tratamientos.

El procesado básico del fraccionamiento y la molienda del cereal han permitido poder afinar, cada vez más, en el análisis de carotenoides estableciendo comparaciones entre las distintas capas del grano de cereal y fracciones comerciales de interés (Ndolo y Beta, 2013). Los análisis de productos integrales y de aquellos desprovistos del germen (Kean *et al.*, 2008), harina sin salvado y fracciones del mismo (Žilić *et al.*, 2012), granos integrales y descascarillados (Kean *et al.*, 2011), granos, harinas y sémolas (Fares *et al.*, 2008; Luterotti y Kljak, 2010) suelen encontrarse entre las comparaciones más frecuentes. Uno de los primeros trabajos detallado realizado al respecto es el de Blessin *et al.* (1963) en granos de maíz. Estos autores analizan el efecto sobre el contenido en pigmentos del fraccionamiento manual e industrial de las distintas capas del grano. Sellappan *et al.* (2009) evalúan las pérdidas en β -caroteno, hierro y zinc en granos de arroz transgénicos pulidos estimándose ésta en más de un 70%. El pulido es una práctica industrial habitual de este cereal que conlleva la eliminación casi al completo de la capa de aleurona y del embrión (Juliano, 1994). Como se introdujo anteriormente, las técnicas de procesado pueden

emplearse con fines en la mejora de cultivos con independencia de su utilidad básica en la generación de alimentos derivados o preparación de los mismos. La clasificación de genotipos de cereales, mediante la caracterización de su contenido en pigmentos atribuido a fracciones específicas del grano, puede ser útil en este sentido. Análisis descriptivos como los de Siebenhandl *et al.* (2007) constituye un ejemplo al respecto, en los que la evaluación de fracciones con distintos tamaños de partícula de salvado y harinas facilita la clasificación y selección de diversos genotipos de trigos y cebadas. El tamaño de partícula generada en estos procesos tiene una gran influencia no solo desde el punto de vista técnico sino nutricional. Así, la reducción del tamaño de partícula puede facilitar la liberación de vitaminas y fitonutrientes desde las capas más externas del grano (Kahlon *et al.*, 1986; Zhou *et al.*, 2004a; Fratianni *et al.*, 2005). Zhou *et al.* (2004a) comprobaron que la micronización de la capa de aleurona se tradujo en una mayor capacidad antioxidante comparada con la no micronizada, el salvado y el grano, debido quizás a una mayor disponibilidad de los antioxidantes

Los diversos tratamientos térmicos que se aplican en cereales, con el objetivo de ampliar la vida útil de los productos, también han sido reproducidos a escala de laboratorio para determinar el efecto en el contenido carotenoides. El tostado de cereales parece tener bastante repercusión desencadenando una reducción significativa en el contenido de pigmentos. En este sentido, De Oliveira y Rodríguez-Amaya (2007) analizaron una serie de productos crudos y procesados derivados del maíz encontrando unas pérdidas de aproximadamente el 60%. Resultados similares fueron encontrados como consecuencia de la cocción del arroz (Lamberts y Delcour, 2008). Diversos tratamientos térmicos son comparados por Scott y Eldridge (2005) al analizar el perfil carotenoides en maíz fresco, congelado y enlatado. En este caso, por el contrario, el procesamiento térmico de maíz para enlatarlo no produce una disminución relevante del contenido carotenoides. Por otro lado se observa que el tratamiento de escaldado que se aplica antes de congelar los granos, se traduce en un aumento en la bioaccesibilidad de los carotenoides. El calentamiento por microondas de salvado de arroz también produce efectos similares, no suponiendo una reducción del nivel de pigmentos, por lo que se propone como una buena alternativa para favorecer la conservación y estabilización de esta fracción del grano (Abdul-Hamid *et al.*, 2007). Un tratamiento más complejo constituye la extrusión la cual es un proceso multi-etapas ampliamente empleado en la industria para generar los cereales de desayuno. Las condiciones suaves aplicadas durante la extrusión (contenido alto de humedad, tiempo de residencia bajo y baja temperatura) tienen un claro efecto positivo sobre la retención de vitaminas y carotenoides, y disminución de la peroxidación lipídica entre otros (Cheftel, 1986; Singh *et al.*, 2007). Guzmán-Tello y Cheftel (1990) estudiaron los

cambios en la concentración de β -caroteno bajo condiciones más severas en la extrusión de harina de trigo estimando las pérdidas en un rango de 38-73% de éste cuando la temperatura aplicada osciló entre 125-200°C. Otros procesados como el malteado de la cebada destacan por generar resultados bastantes dispares cuando se evalúa el efecto de dicho procesado sobre el nivel de pigmentos. Así Goupy *et al.* (1999) en un estudio de distintas variedades de cebada registran tanto pérdidas (aproximadamente del 76%) como ganancias en el contenido carotenoide.

Los análisis realizados durante los distintos pasos de procesado de las sémolas y generación de pastas indican que es durante la etapa de amasado cuando se registran las mayores pérdidas en pigmentos carotenoides, mientras que el posterior periodo de secado y maduración resulta ser el menos agresivo (Panfili *et al.*, 2005; Hidalgo *et al.*, 2010; Fratianni *et al.*, 2012). Al igual que para el caso anterior la obtención de pan, bollos y galletas también concentran pérdidas considerables durante el amasado (Leenhardt *et al.*, 2006b). Algunos autores, no obstante, describen otras etapas en las que las mermas en pigmentos pueden cobrar también protagonismo como es la fase del horneado. En un estudio acerca de la evolución de pigmentos durante la fabricación de pan, a partir de trigo harinero y Einkorn, Hidalgo *et al.* (2010) registran pérdidas medias del 47% para la corteza de pan frente al 21% para la miga de éste. Al comparar ambos tipos de trigo observaron pérdidas menores en Einkorn, caracterizado por presentar un mayor contenido en pigmentos. La degradación durante el amasado está gobernada por una oxidación enzimática de los pigmentos lo que ha llevado a diversos autores a relacionar ambos aspectos (actividades enzimáticas degradativas, perdidas en carotenoides) como parte de programas de mejora para la selección de genotipos de cereales cada vez más óptimos para aplicaciones panaderas (Trono *et al.*, 1999; Borrelli *et al.*, 2003; Leenhardt *et al.*, 2006a,b; Fu *et al.*, 2013).

Para el caso de tritordeum, como se introdujo antes, las propiedades de este nuevo cereal lo hacen más apto para aplicaciones panaderas, similares a las del trigo harinero, y por el contrario menos adecuado para la fabricación de sémolas. Recientemente las harinas de tritordeum han empezado a comercializarse, aventurando multiple aplicaciones para ellas como fabricación de pan, pan de molde, galletas, madalenas u otros productos cerealistas (www.agrasys.es). En este sentido, aunque el proceso de elaboración de pan y otros derivados supone pérdidas del contenido carotenoide, como para cualquier cereal, el pan de tritordeum presenta unos niveles más superiores de luteína (seis veces más) que el que presenta los panes de trigos convencionales (según análisis realizado en nuestro laboratorio para Agrasys). Dichos resultados, aunque todavía muy prematuros, se asemejan a los comentados anteriormente para el trigo Einkorn.

3. OBJETIVOS

La hipótesis de partida de este trabajo de investigación es la posibilidad de obtener cereales con un mayor contenido en pigmentos carotenoides, y una mayor retención y estabilidad de los mismos, extensible a los productos derivados de los cereales, consiguiendo de este modo alimentos funcionales con un gran impacto en la alimentación humana y mayor accesibilidad por la población de países en vías de desarrollo. A fin de verificar la viabilidad de dicha hipótesis y comprobar si el desarrollo de nuevos cereales, como es el caso de *tritordeum*, resultarían ser buenos candidatos a tal efecto, el objetivo general de la presente Tesis Doctoral ha sido la caracterización de la composición carotenoide en trigos duros comerciales (*Triticum turgidum* var. *durum*) y en líneas avanzadas de *tritordeum* (*H. chilense* x *T. turgidum* conv. *Durum*), así como el estudio del metabolismo carotenoide durante el desarrollo de los granos y posterior almacenamiento de éstos y de las harinas resultantes de su procesado.

Para la consecución de dicho objetivo se plantearon los siguientes objetivos parciales:

- Aislamiento, identificación y cuantificación de los pigmentos carotenoides (libres y esterificados) presentes en granos de trigo duro y tritordeum.
- Identificación del patrón de esterificación de las xantofilas, y estudio de la composición de ácidos grasos presentes en trigo duro y tritordeum, a fin de establecer una hipótesis sobre la naturaleza del proceso de esterificación de xantofilas en cereales.
- Análisis del perfil de pigmentos carotenoides durante el desarrollo del grano en trigo duro y tritordeum, así como su relación con la expresión de los genes carotenogénicos durante el mismo, al objeto de determinar la regulación de dicha ruta en trigo duro y tritordeum.
- Estudio de la estabilidad de los pigmentos carotenoides en función de las condiciones de almacenamiento de granos y harinas de trigo duro y tritordeum, que permita valorar las mejores condiciones de almacenamiento para estos alimentos.



4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. Descripción del material vegetal.

El material vegetal estudiado en el presente trabajo de investigación ha contemplado un total de cinco variedades comerciales de trigo duro (Don Pedro, Simeto, Claudio, Kofa y UC1113), así como cinco líneas avanzadas de tritordeum (HT621, HT630, HT609, HT335 y HT240).

La variedad Don Pedro, fue obtenida en México por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), y registrada en España en 1990. La planta posee un porte medio, de espigado precoz y presenta una buena resistencia a enfermedades como el oídio, la roya amarilla, la roya parda y septoria. La variedad Simeto fue obtenida y registrada en Italia en 1998. Se trata de un trigo duro de ciclo medio, de espigas grandes y compactas y con aristas negras. Se trata de la variedad más ampliamente utilizada en Europa (más del 25% de la cosecha) por sus excelentes parámetros de calidad: alto rendimiento en sémola, extraordinario contenido en gluten y elevado valor de proteína. La variedad Claudio, al igual que la anterior, fue obtenida y registrada en 1998 en Italia por la empresa Sinagro. La planta tiene un porte medio alto, de ciclo alternativo, y al igual que Simeto, presenta espigas claras con aristas negras, siendo el grano de color blanco. Presenta una resistencia de media a baja para el oídio, siendo por el contrario, alta para el caso de la septoria y la roya parda. La variedad Kofa fue desarrollada por el Western Plant Breeders (USA) en 1994, presentando excelentes cualidades tecnológicas (alto contenido en proteínas y gluten, valores elevado de índice de color). La variedad UC1113 fue desarrollada y mejorada en la Universidad de California (Davis, USA) y se caracteriza por tener un alto rendimiento de cosecha, aunque sus cualidades con aplicaciones para la preparación de pasta son intermedias al presentar un índice de color reducido. Las variedades Kofa y UC1113 se han utilizado para producir 93 líneas recombinantes endogámicas (RILs) en las que se han mapeado caracteres de calidad, entre los que se incluye el contenido carotenoide (YPC).

Los *tritordeum* empleados (HT621, HT630, HT609, HT335 y HT240) son líneas avanzadas desarrolladas dentro del Programa de Mejora de *Tritordeum*, dirigido por el Prof. Dr. Antonio Martín Muñoz en el Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC) de Córdoba, y caracterizadas por presentar un alto contenido en carotenoides.

La **Figuras 38** muestra fotografías de los granos de las variedades/líneas de trigo duro y tritordeum utilizadas en el presente estudio. La **Figura 39** resume las variedades/líneas que fueron utilizadas en función de objetivos planteados.



Figura 38. Fotografías de los granos de las variedades/líneas de trigo duro y tritordeum estudiadas.

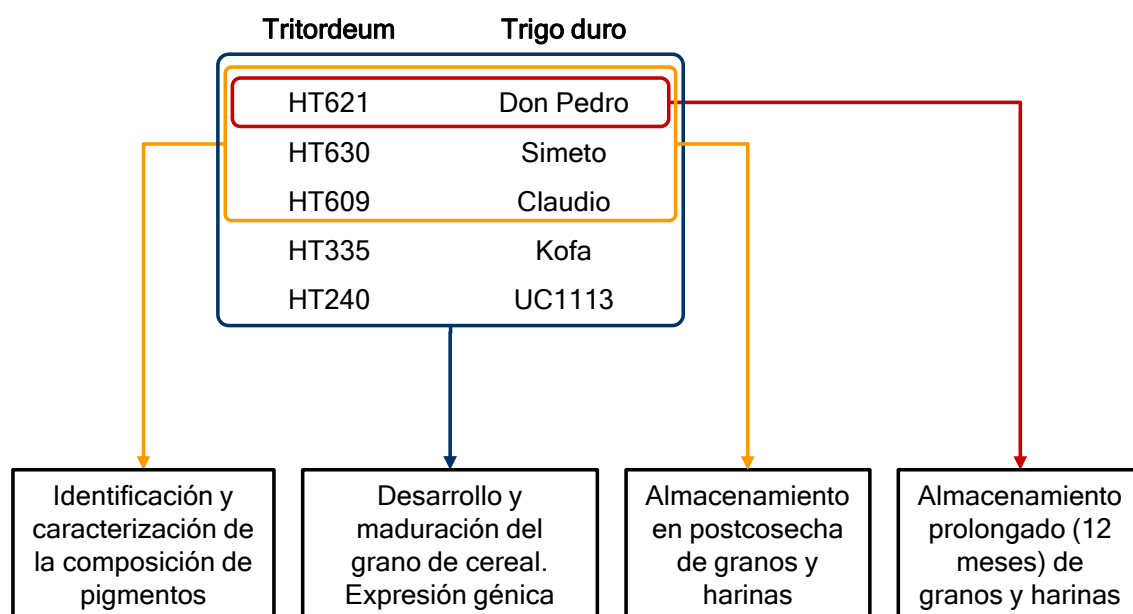


Figura 39. Variedades de trigo duro y tritordeum empleadas en el presente trabajo de investigación con indicación de los experimentos en los que se han usado.

Todas las harinas estudiadas fueron integrales al estar preparadas por molienda a partir de los granos enteros según se describirá más adelante. En el caso de las experiencias de almacenamiento prolongado (12 meses) de los granos y sus respectivas harinas se utilizaron las variedades HT621 y Don Pedro como representativas de ambas especies. Los granos de trigo duro (Don Pedro) correspondían a la campaña 2006/2007 y los de tritordeum (HT621) al año 2008, habiendo estado conservados a 4°C hasta la puesta en marcha de tales experimentos.

4.2. Diseños experimentales.

4.2.1. Estudio de la evolución del perfil carotenóide durante el desarrollo del grano y análisis de expresión de genes de la ruta de carotenogénicos.

Al objeto de progresar en el conocimiento del metabolismo carotenóide en vegetales abordando aspectos relacionados con la biosíntesis y acumulación de éstos, se analizó la evolución del contenido y composición de pigmentos carotenoides durante el desarrollo y maduración de los granos de ambos cereales, trigo duro y tritordeum, así como la expresión de los principales genes que codifican las enzimas implicadas en la carotenogénesis para correlacionar dichos niveles con el contenido de pigmentos observado a lo largo del desarrollo de los distintos granos. Para ello se diseñó un ensayo de campo completamente aleatorizado con 2 bloques (B1 y B2) por variedad (Trigo duro: Don Pedro, Simeto, Claudio,

Kofa y UC1113; Tritordeum: HT621, HT630, HT609, HT240 y HT335) (**Figura 40**). Estos experimentos se llevaron a cabo en las instalaciones del Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC) de Córdoba, siendo coordinados por el Dr. Sergio G. Atienza. Cada genotipo estuvo representado por 1 surco con 10 plantas separadas 10 cm entre sí. Para cada genotipo se determinó la fecha de antesis y se dejó autopolinizar embolsando las espigas para evitar cualquier posibilidad de cruzamiento espontáneo. La toma de muestras se realizó, entre marzo y abril del 2010, sustrayendo los granos en desarrollo de la parte media central de la espiga. Se tomaron muestras a los 8, 14, 18 y 25 días después de la antesis (DDA). Las muestras fueron inmediatamente congeladas y almacenadas a -80°C hasta los posteriores análisis.

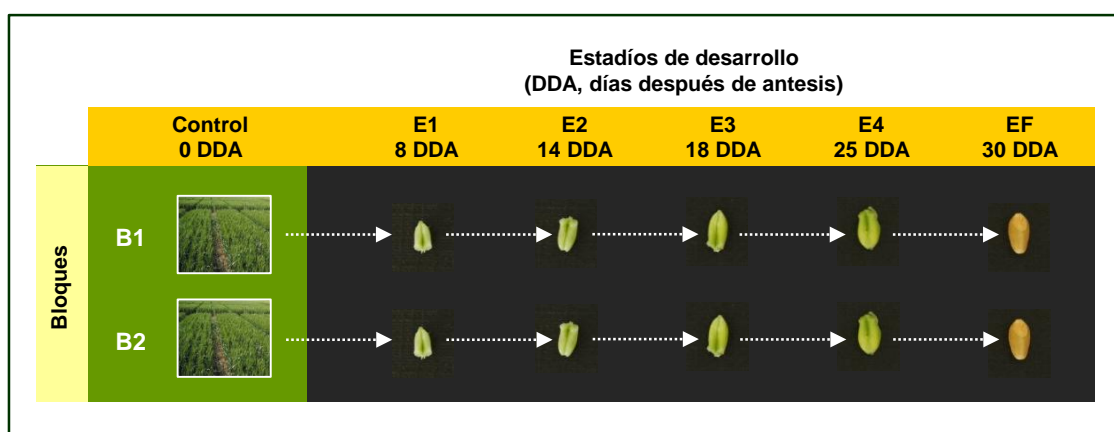


Figura 40. Diseño experimental para el análisis de evolución de pigmentos y expresión de genes carotenogénicos durante el desarrollo y maduración del grano. Dos bloques al azar por variedad (B1 y B2). Estadios de desarrollo y maduración: E1 (8 DDA), E2 (14 DDA), E3 (18 DDA), E4 (25 DDA) y EF (maduro). Material vegetal: trigo duro (Don Pedro, Simeto, Claudio, Kofa y UC1113) y tritordeum (HT621, HT630, HT609, HT240 y HT335).

4.2.2. Evolución y estabilidad de pigmentos carotenoides durante el almacenamiento en postrecolección de granos maduros de trigo duro y tritordeum.

Al objeto de evaluar el efecto de las condiciones de almacenamiento (tiempo/temperatura) sobre el metabolismo de los pigmentos carotenoides durante el almacenamiento de granos en postcosecha, se dispuso de granos de tres variedades trigo duro (Don Pedro, Simeto y Claudio) y tritordeum (HT630, HT621 y HT609) recolectados inmediatamente tras alcanzar la total madurez (**Figura 41**). Los granos fueron dispuestos en tres bloques (B1, B2 y B3) por cada variedad, los cuales fueron mantenidos en cámara o

estufas termostatzadas a 4, 20 y 37°C. El muestreo se realizó a los 0 (control), 30 (M1), 60 (M2) y 90 (M3) días. En cada muestreo, y para cada variedad, se retiró de cada bloque una cantidad aproximada de 15 gramos de granos, que fue conservada a -30°C hasta el posterior análisis.

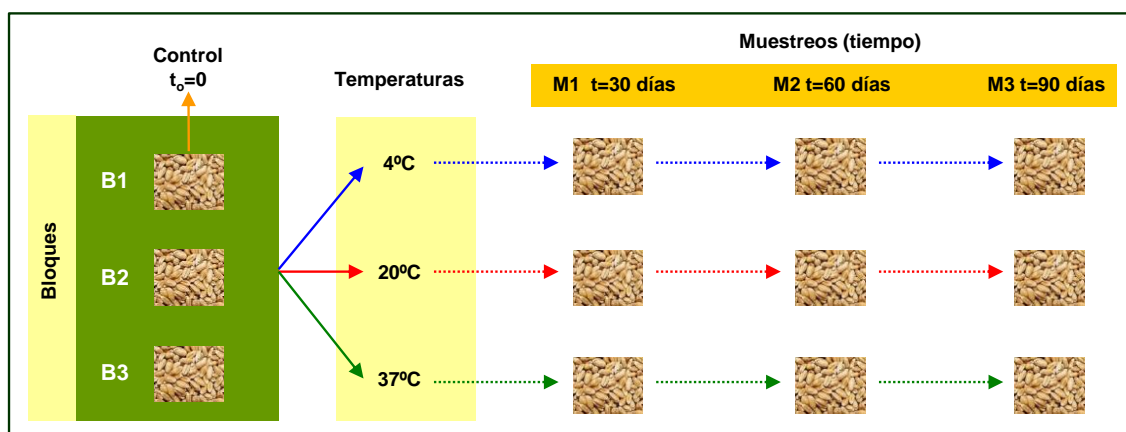


Figura 41. Diseño experimental para el análisis de evolución de pigmentos carotenoides durante el almacenamiento en postcosecha de granos maduros. Tres bloques al azar por variedad (B1, B2 y B3). Temperaturas de almacenamiento: 4, 20 y 37°C. Muestras: Control (0 días), M1 (30 días), M2 (60 días) y M3 (90 días). Material vegetal: trigo duro (Don Pedro, Simeto, Claudio) y tritordeum (HT621, HT630, HT609).

4.2.3. Estudio preliminar de evolución y estabilidad de pigmentos carotenoides durante el almacenamiento controlado de harinas integrales de trigo duro y tritordeum.

La harina constituye uno de los productos derivados de cereales más importantes en cuanto a sus múltiples aplicaciones. Por su extendido uso, resulta de especial interés conocer el efecto del almacenamiento sobre el contenido y perfil de pigmentos carotenoides en harinas mantenidas a diferentes temperaturas. Para tal fin se realizó un estudio preliminar empleando harinas integrales preparadas con los granos maduros utilizados para el estudio de almacenamiento en postrecolección de los mismos. Para la obtención de las harinas se utilizaron 50 gramos de granos de cada muestra, los cuales fueron molidos mediante un molino de martillo con un tamiz de salida de 2 mm. La harina se distribuyó en alícuotas de aproximadamente 1 gramo (anotando el peso exacto hasta el cuarto decimal) en el interior de tubos Falcon® de 15 mL que fueron dispuestas en gradillas situadas en el interior de cámaras o estufas termostatzadas a 4, 20, 37 y 50°C. Se tomaron 4 muestras control (tiempo=0 días) por variedad. Para cada variedad se dispuso un total de 24

muestras correspondientes a un demuestre mensual por duplicado a 30 (M1), 60 (M2) y 90 (M3) días sometidas a las temperaturas 4, 20, 37 y 50°C (**Figura 42**).

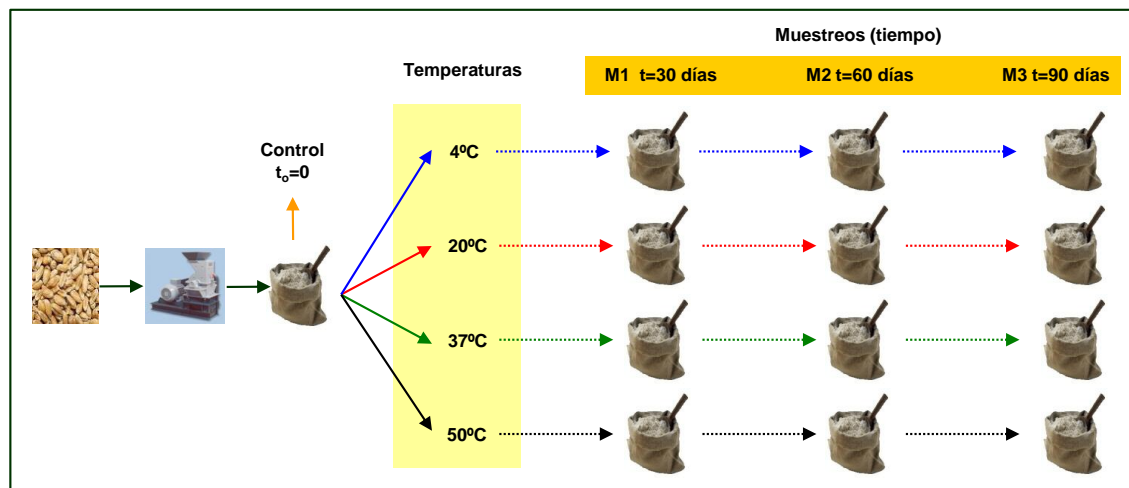


Figura 42. Diseño experimental para el análisis de evolución y estabilidad de los pigmentos carotenoides durante el almacenamiento de harinas integrales de trigo duro y tritordeum. Temperaturas de almacenamiento: 4, 20, 37 y 50°C. Muestreos: Control (0 días), M1 (30 días), M2 (60 días) y M3 (90 días). Material vegetal: harinas de trigo duro (Don Pedro, Simeto, Claudio) y harinas de tritordeum (HT621, HT630, HT609).

4.2.4. Estudio de la evolución y estabilidad de los pigmentos carotenoides durante el almacenamiento prolongado (12 meses) de granos y harinas integrales de trigo duro y tritordeum.

Con el objetivo de investigar la evolución del contenido y composición de pigmentos carotenoides durante el almacenamiento de granos y harinas de trigo duro y tritordeum, así como evaluar el efecto de las condiciones impuestas sobre la estabilidad de los mismos y la cinética del proceso, se realizó un seguimiento de los pigmentos carotenoides presentes en granos y harinas durante un periodo de 12 meses. El experimento se realizó con granos de la variedad Don Pedro de trigo duro y HT621 de tritordeum. Al objeto de asegurar la total madurez de los granos se seleccionaron semillas correspondientes a campañas anteriores. En este sentido, los granos de trigo duro (Don Pedro) correspondían a la campaña 2006/2007 y los de tritordeum (HT621) al año 2008, habiendo estado conservados a 4°C hasta la puesta en marcha de los experimentos. Para ambas variedades se prepararon las correspondientes harinas integrales (aproximadamente 300 gramos) empleando un molino de bolas Retsch modelo MM400 (condiciones de molienda: 2 bolas de acero de 15 mm de diámetro, 25 Hz de frecuencia y 1 minuto de tiempo de molienda). Tanto los granos como

las harinas fueron distribuidos en alícuotas de aproximadamente 4 gramos en el interior de tubos Falcon® de 15 mL que fueron dispuestas en gradillas situadas en el interior de cámaras o estufas termostatzadas a -32, 6, 20, 37 y 50°C, siendo dicha cantidad suficiente para realizar un análisis por triplicado de cada muestra (1 g de grano o harina por análisis). Se tomaron 5 muestras control (tiempo=0 días) por variedad. Para cada variedad y tipo de muestra (granos y harinas) se dispuso un total de 180 muestras correspondientes a un demuestre mensual por triplicado a 30 (M1), 60 (M2), 90 (M3), 120 (M4), 150 (M5), 180 (M6), 210 (M7), 240 (M8), 270 (M9), 300 (M10), 330 (M11) y 360 (M12) días sometidas a las temperaturas -32, 6, 20, 37 y 50°C Las muestras fueron congeladas a -80°C hasta su procesamiento y análisis, En las **Figuras 43 y 44** se describen los correspondientes diseños experimentales. Durante el transcurso de la experiencia se realizó un seguimiento continuo de las temperaturas de almacenamiento, registrándose con una frecuencia de días alternos.

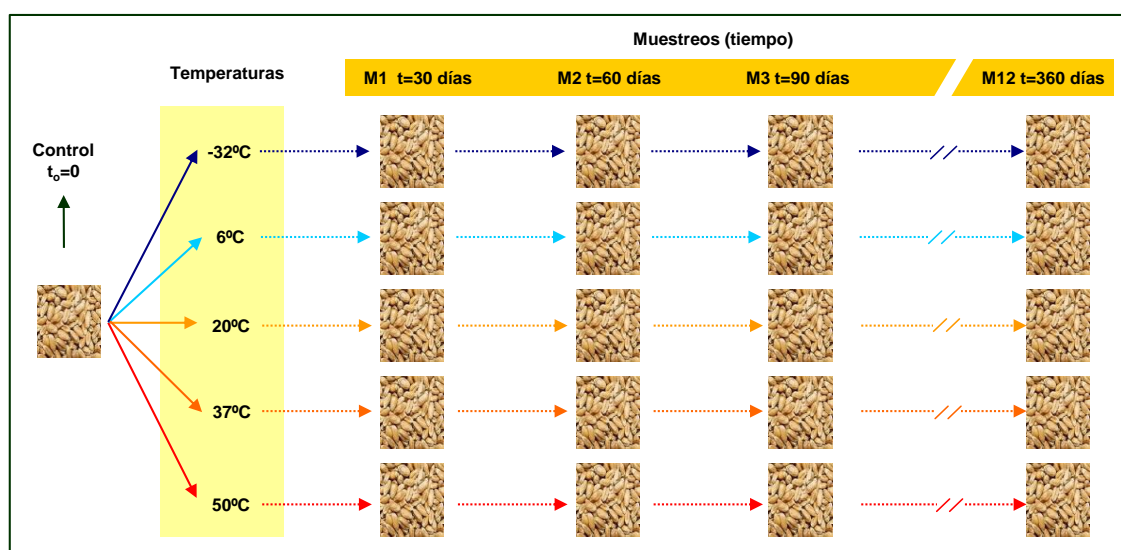


Figura 43. Diseño experimental para el análisis de evolución y estabilidad de los pigmentos carotenoides durante el almacenamiento de granos de trigo duro (variedad Don Pedro) y tritordeum (línea HT621). Temperaturas de almacenamiento: -32, 6, 20, 37 y 50°C. Muestreos: Control (0 días), 30 (M1), 60 (M2), 90 (M3), 120 (M4), 150 (M5), 180 (M6), 210 (M7), 240 (M8), 270 (M9), 300 (M10), 330 (M11) y 360 (M12).

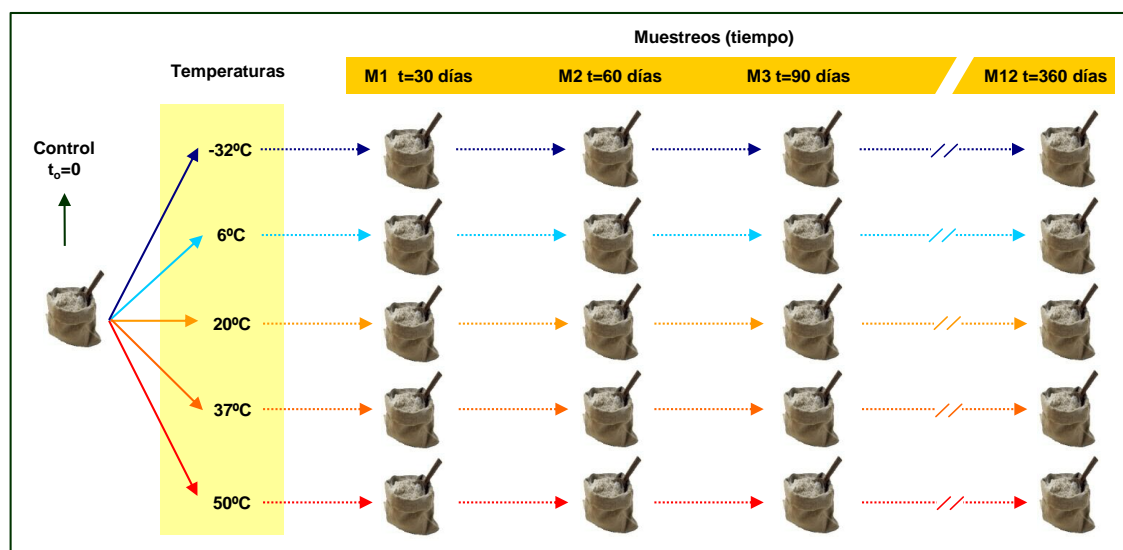


Figura 44. Diseño experimental para el análisis de evolución y estabilidad de los pigmentos carotenoides durante el almacenamiento de harina integrales de trigo duro (variedad Don Pedro) y tritordeum (línea HT621). Temperaturas de almacenamiento: -32, 6, 20, 37 y 50°C. Muestreos: Control (0 días), 30 (M1), 60 (M2), 90 (M3), 120 (M4), 150 (M5), 180 (M6), 210 (M7), 240 (M8), 270 (M9), 300 (M10), 330 (M11) y 360 (M12).

4.3. Determinación de humedad relativa de granos en desarrollo y maduros.

Con el objetivo de expresar los datos de concentración de pigmentos en base a peso seco se determinó la humedad relativa de las muestras de trigo duro y tritordeum. Las mediciones fueron realizadas con el analizador de humedad Ohaus MB35.

4.4. Análisis de pigmentos.

4.4.1. Extracción de pigmentos.

La extracción de pigmentos fue realizada siguiendo protocolos puestos a punto en nuestro laboratorio, los cuales fueron adaptados en función del tipo de muestra (grano, harina, estadio de desarrollo) y el número de muestra a analizar en cada apartado del presente trabajo de investigación. A continuación se describen los métodos utilizados:

4.4.1.1. Extracción de pigmentos para la identificación, caracterización pormenorizada y cuantificación preliminar del perfil carotenoides en muestras de trigo duro y tritordeum.

La extracción de pigmentos carotenoides se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Atienza *et al.* (2007b) previamente desarrollado en nuestro laboratorio, con algunas

modificaciones, tal y como se describe en la **Figura 45**. Se empleó aproximadamente un gramo de muestra (grano o harina). En el caso de los granos, antes de la extracción la muestra debe ser molida, para lo cual se utilizó un molino manual de especias. La extracción se realizó en tubos falcon® de 15 mL, añadiendo 4 mL de acetona conteniendo 0.1% de BHT (Butilhidroxitolueno), agitando en vortex durante 2 minutos, y posterior sonicación durante 5 minutos. El extracto resultante se centrifugó a 5000 rpm y 4°C durante 5 minutos, y el sobrenadante, conteniendo los pigmentos carotenoides, se traspasó cuidadosamente con una pipeta pasteur a otro tubo de ensayo. La operación de extracción se repitió en total tres veces, y todas las fracciones se reunieron en el mismo tubo. En la puesta a punto del método se constató que una cuarta extracción era innecesaria. El disolvente se evaporó bajo corriente de nitrógeno, y el extracto seco resultante se disolvió en 0.5 mL de acetona y se almacenó a -30°C hasta su posterior análisis mediante HPLC. El análisis de pigmentos se realizó por triplicado. Todas las operaciones se realizaron bajo luz verde para evitar la isomerización y fotodegradación de los pigmentos.

4.4.1.2. Extracción y cuantificación de pigmentos (clorofilas y carotenoides) durante el desarrollo de los granos.

Para la extracción de los pigmentos cloroplásticos, clorofilas y carotenoides, presentes en los granos en diferentes estadios de desarrollo se desarrolló un método de extracción asistida por molienda por vía húmeda en presencia del extractante (**Figura 46**). Para tal fin el protocolo fue optimizado realizando diversas pruebas atendiendo a las condiciones de molienda (tiempo, velocidad y volumen de disolvente extractante). Las mejores condiciones seleccionadas consisten en moler los granos (3 granos con independencia del estadio de madurez) en un tubo Eppendorf® en presencia de 2 bolas de acero de 5 mm y 1 mL de acetona conteniendo 0.1% de BHT. Tras congelar el tubo conteniendo la muestra en nitrógeno líquido, se procedió a la molienda/extracción aplicando 25 Hz de velocidad durante 6 minutos. El extracto resultante se centrifugó a 13000 rpm y 4°C durante 5 minutos. El sobrenadante conteniendo los pigmentos se transfirió a otro tubo Eppendorf, centrifugándose de nuevo en las mismas condiciones, analizándose seguidamente mediante HPLC. El protocolo desarrollado permitió el análisis simultáneo de 20 muestras, con las consecuentes ventajas, al tiempo que usa cantidades muy reducidas de disolventes y reduce al mínimo la manipulación de las muestras. El análisis de pigmentos se realizó por duplicado para cada bloque y estadio de desarrollo. Todas las operaciones se llevaron a cabo bajo luz verde para evitar la fotodegradación de los pigmentos.

4.4.1.3. Extracción de pigmentos carotenoides en granos maduros, así como en las muestras de granos y harinas correspondientes a los ensayos de almacenamiento prolongado.

Dado el elevado número de muestras a analizar en los experimentos de almacenamiento de granos y harinas de trigo duro y tritordeum, así como los análisis de granos maduros correspondientes a los experimentos de desarrollo, se planteó la adaptación del protocolo rutinario de extracción (descrito en el apartado 4.4.1.1) en base a la técnica de extracción asistida por molienda. Esta técnica permite la extracción y molienda simultánea de los granos y harinas, especialmente en los primeros, en un tiempo muy reducido (1 minuto), reduciendo el tiempo total de preparación del extracto previo al análisis por HPLC en tan solo 12 minutos (**Figura 47**). El protocolo desarrollado permitió la extracción simultánea de 2 muestras, mediante la optimización previa de las condiciones de molienda: tiempo, velocidad, tamaño de bolas, volumen de disolvente y relación muestra/disolvente. Brevemente, la muestra (1 gramo de grano o harina, según el tipo de muestra) se colocó en un tarro de molienda de acero inoxidable de 25 mL de capacidad, junto con 2 bolas de acero de 15 mm, 6 ml de acetona conteniendo 0.1% de BHT, y una cantidad conocida de patrón interno (β -Apo-8'-carotenal; 1.7 μ g para trigo duro y 3.4 μ g para tritordeum). En las muestras correspondientes a las temperaturas más elevadas (37 y 50 °C) de los experimentos de almacenamiento prolongado, la cantidad de patrón interno se fue reduciendo paulatinamente al objeto de adaptarla a los niveles de carotenoide remanentes. Las condiciones de molienda seleccionadas fueron 25 Hz de velocidad durante un minuto. La mezcla resultante de la molienda se transfirió mediante una pipeta pasteur a un tubo falcon® de 15 mL y seguidamente se centrifugó a 5000 rpm y 4°C durante 5 minutos. El sobrenadante conteniendo los pigmentos se pasó a otro falcon® y el disolvente se evaporó bajo corriente de nitrógeno. Finalmente el extracto seco se disolvió en 0.5 mL de acetona, se centrifugó a 13000 rpm y 4°C durante 5 minutos y congeló a -30 °C hasta su análisis por HPLC. El análisis de pigmentos se realizó, al menos, por triplicado. Todas las operaciones se llevaron a cabo bajo luz verde evitando la fotodegradación de los pigmentos. La **Figura 48** muestra el equipo de molienda (Retsch, MM400) utilizado para el desarrollo del método, así como los tarros de molienda y las bolas (15 mm) empleadas.

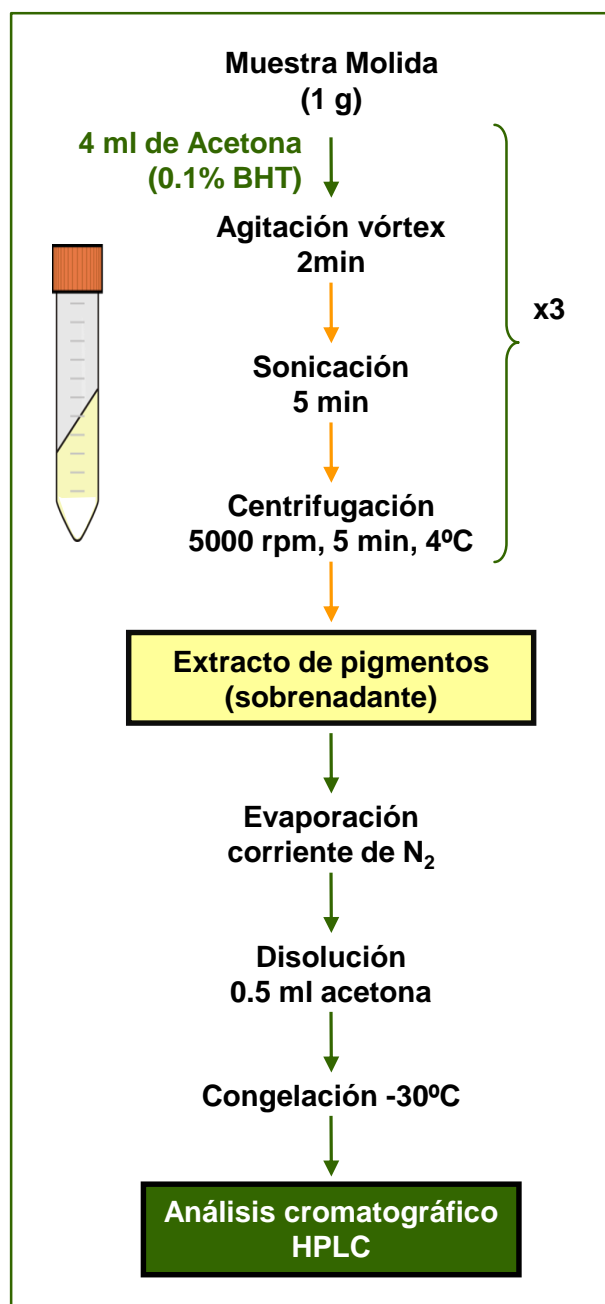


Figura 45. Esquema del protocolo general de extracción de pigmentos carotenoides a partir de granos y harinas de trigo duro y tritordeum utilizados para la identificación y caracterización, así como en los ensayos de almacenamiento en postrecolección de granos maduros, y de almacenamiento corto de harinas.

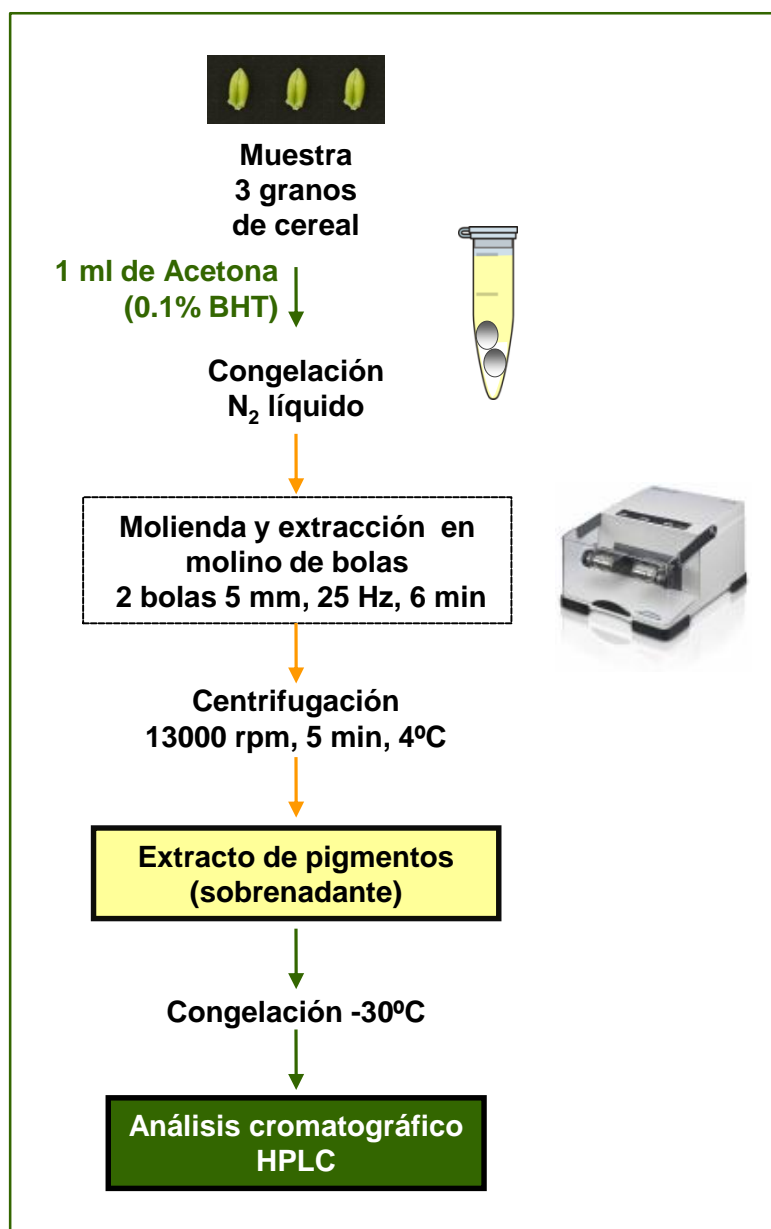


Figura 46. Esquema del protocolo de extracción de pigmentos cloroplásticos a partir de granos en desarrollo.

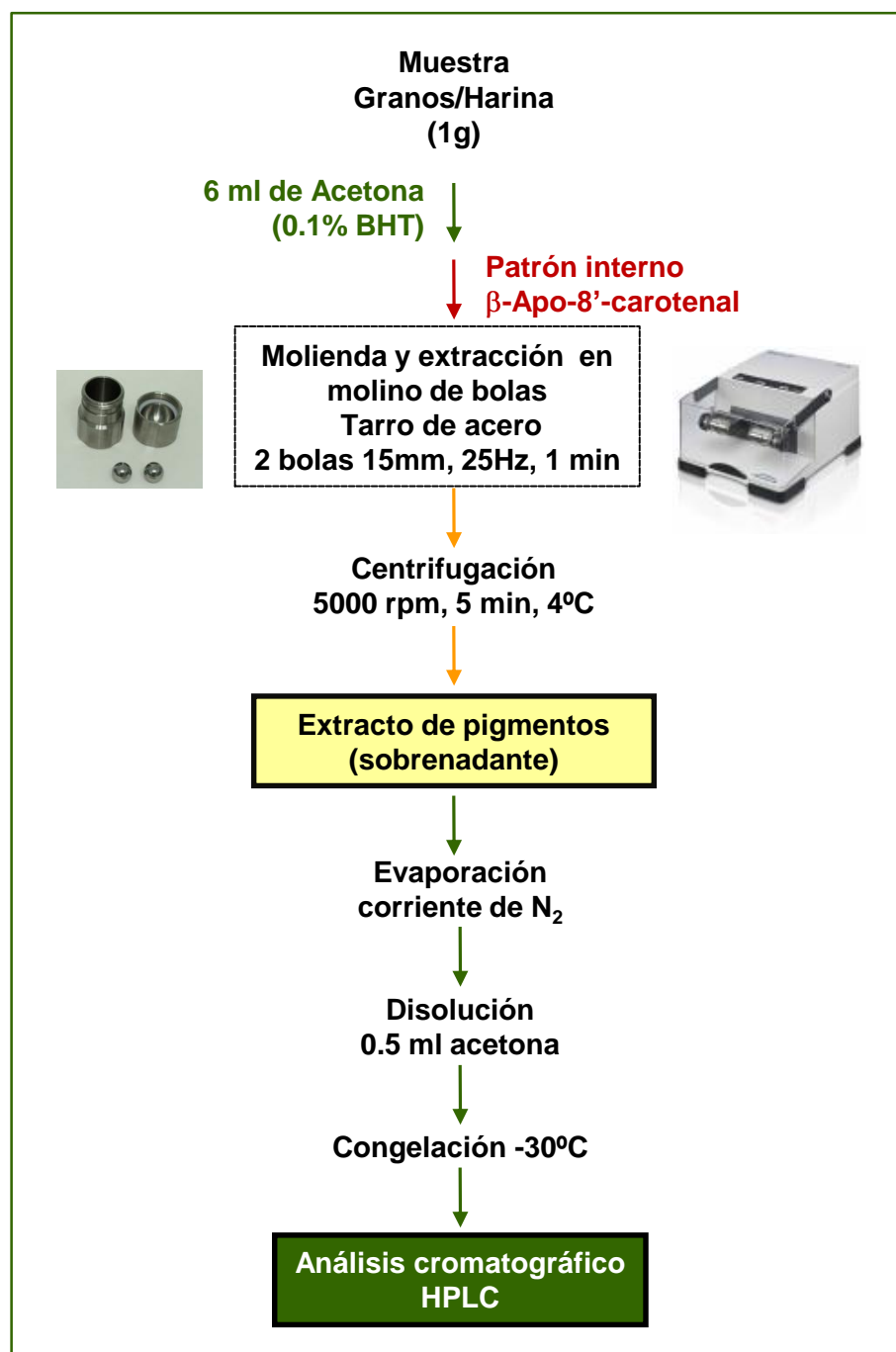


Figura 47. Esquema del protocolo de extracción de pigmentos carotenoides a partir de granos maduros procedentes de los ensayos de desarrollo de grano, así como los granos y harinas de los experimentos de almacenamiento prolongado.

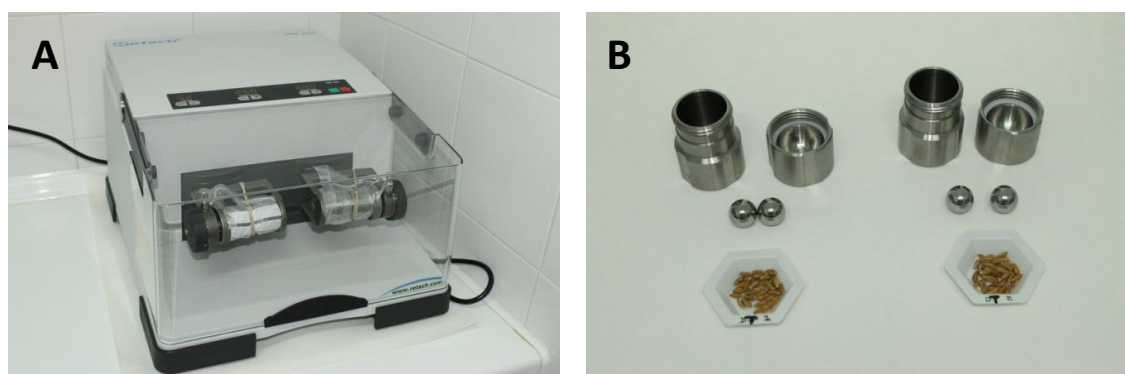


Figura 48. Equipo de molienda Retsch MM400 (A), tarros (25 mL) y bolas de acero inoxidable (15 mm) empleados para la extracción de carotenoides asistida por molienda (B).

4.4.2. Saponificación de extractos de pigmentos carotenoides.

La saponificación de las muestras, exclusivamente para fines de identificación de pigmentos, se llevó a cabo en tubos falcon® de 15 mL, conteniendo el extracto de pigmentos solubilizados en 2 mL de éter dietílico y adicionando 0.5 mL de una solución de KOH-MeOH al 10% (p/v). La mezcla se mantuvo durante 30 minutos, con agitación periódica. La reacción se detuvo mediante la adición de 3 mL de NaCl al 10% (p/v), y la fase acuosa resultante se eliminó. La correspondiente fase orgánica se lavó con agua destilada hasta neutralidad, posteriormente se trató con 4 mL de Na₂SO₄ al 2% (p/v) para eliminar restos de agua, y finalmente se evaporó la muestra bajo corriente de nitrógeno. Los pigmentos se disolvieron en 0.5 mL de acetona, y se almacenaron a -30°C hasta su posterior análisis mediante HPLC.

4.4.3. Síntesis de ésteres de luteína con ácidos grasos.

La reacción de esterificación de luteína con ácido palmítico y ácido linoleico fue realizada en base al protocolo de Young *et al.* (2007) con ligeras modificaciones. El método consistió en la mezcla de 0.018 µmol de xantofila con 3 µmol de ácido graso (1.5 µmol en el caso de la reacción simultánea con los dos ácidos grasos), 5 µmol de N,N'-diciclohexilcarbodiimida y 30 µmol de 1,4-(dimetilamin)piridina, todo ello disuelto en 300 µL de cloroformo. La reacción transcurrió a 25°C en agitación y el tiempo de reacción durante 2 horas, tras lo cual se detuvo la reacción mediante adición de 300 µL de N,N'-dimetilformamida. El cloroformo remanente se eliminó bajo una corriente de nitrógeno. Las muestras fueron congeladas a -30°C hasta su análisis mediante HPLC.



4.4.4. Identificación de pigmentos carotenoides.

La identificación de los pigmentos carotenoides se realizó en función de sus propiedades de absorción electrónica en el rango UV-visible, comportamiento cromatográfico (HPLC y TLC), co-cromatografía con patrones puros, color en placa y disolución. Las características espectrales que mostraban los pigmentos en distintos disolventes (forma del espectro o estructura fina, número y posición de los máximos de absorción, etc.) fueron contrastadas con la información disponible en la bibliografía especializada (Foppen, 1971; Davies, 1976; Davies y Köst, 1980; Britton, 1995; Mínguez-Mosquera *et al.* 1997; Britton *et al.* 2004), la cual debía ser coherente con el cromóforo presente en la estructura propuesta. En el caso de HPLC, la posibilidad de la adquisición de los espectros en tiempo real, mediante el empleo de detectores de array de diodos (DAD), para todos los picos cromatográficos facilita enormemente la aplicación de estos criterios de identificación. Además, siempre que fue posible, entre los criterios de identificación estructural se incluyó la adquisición del espectro de masas. Para la caracterización de grupos funcionales, se ensayaron distintas reacciones químicas específicas, las cuales se describen a continuación (Davies, 1976; Eugster, 1995; Mínguez-Mosquera *et al.* 1997).

Grupos 5,6-epóxidos. Los pigmentos con grupos 5,6-epóxidos en su molécula se transforman en medio ácido en grupos 5,8-epóxidos (furanoides) (**Figura 49**), lo cual lleva asociado una modificación de la forma y la localización de los máximos en el espectro de absorción, así como un cambio del color que muestra el pigmento en solución, observándose en el espectro un desplazamiento hipsocrómico de 15-20 nm si la molécula presenta un grupo 5,6 epóxido y de 35-40 nm si son dos grupos (**Figura 50**). El ensayo se realiza añadiendo una o dos gotas de HCl acuoso al 10% a una disolución etanólica del pigmento. El curso de la reacción puede seguirse espectrofotométricamente (se realiza en la cubeta del espectrofotómetro), o incluso mediante HPLC, lo cual permite así mismo identificar los productos de la reacción (5,8-epóxidos). Esta reacción ácida también se puede llevar a cabo en la placa de cromatografía (TLC), de tal forma que una vez desarrollado el cromatograma se expone el pigmento a vapores de HCl concentrado. Los diepóxidos dan un color azul intenso mientras que los monoepóxidos adquieren una tonalidad azul verdosa. Los carotenoides con dos grupos hidroxilos exclusivamente, adquieren un color marrón bordeado de verde. El resto de carotenoides no deben cambiar de color o pasan a marrón.

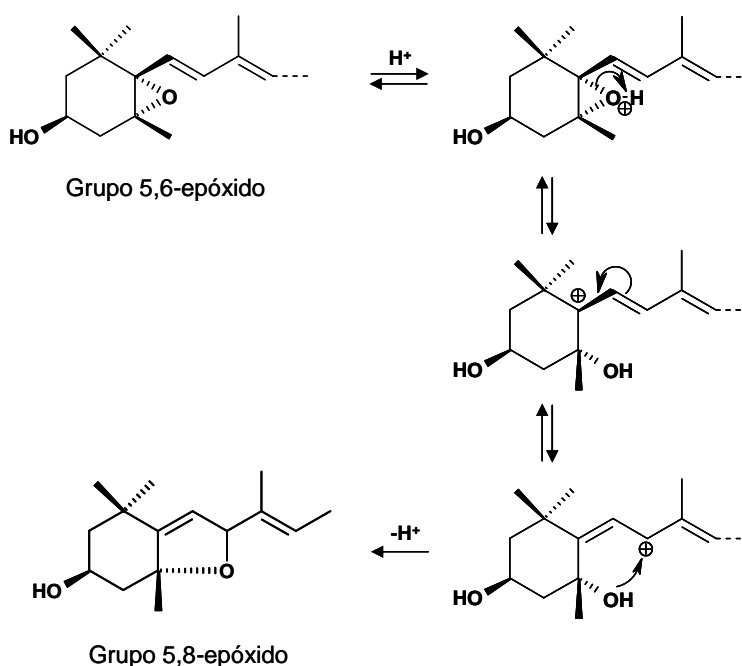


Figura 49. Esquema de la reacción de la reorganización interna del grupo funcional 5,6-epóxido a grupo 5,8-epóxido catalizada por medio ácido.

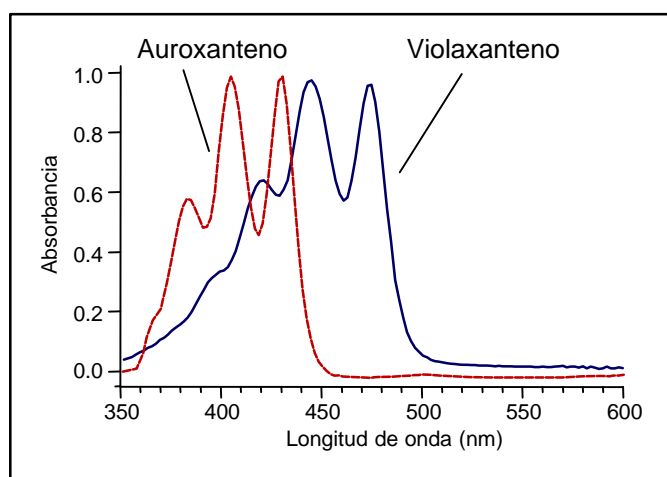


Figura 50. Prueba de grupo funcional 5,6-epóxido. (Ejemplo: Modificación del espectro de absorción de violaxanteno por reorganización interna del grupo funcional 5,6-epóxido a grupo 5,8-epóxido (conversión a auroxanteno) catalizada por medio ácido en etanol).

Grupos carbonilos. Los grupos carbonilos se detectan fácilmente mediante reducción a alcoholes empleando hidruros metálicos como LiAlH_4 ó NaBH_4 (**Figura 51**). El LiAlH_4 es un agente reductor mucho más fuerte, que reduce no sólo aldehídos y cetonas, sino también ácidos, ésteres y otros grupos funcionales polares. El ensayo se lleva a cabo añadiendo algunos cristales de NaBH_4 a una solución del pigmento en etanol del 95% y dejando reaccionar durante 3 horas en refrigerador. Pasado este tiempo se transfiere el

pigmento a éter dietílico. Modificaciones en el espectro de absorción tales como descenso en la absorbancia (intensidad de color), un desplazamiento hipsocrómico del máximo de absorción, y un cambio notable en la forma del espectro (aumento de la estructura fina) suelen ser signos evidentes de que la reducción se ha llevado a cabo y por lo tanto la existencia de grupos carbonilos (**Figura 52**).

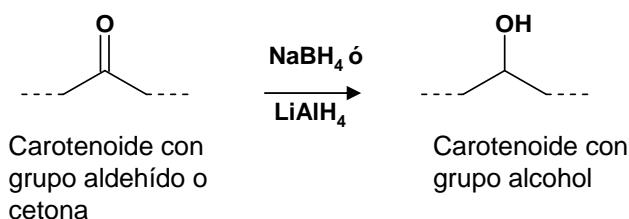


Figura 51. Esquema de la reacción de la reducción de grupo carbonilo a grupo hidroxilo en presencia de NaBH_4 o LiAlH_4 .

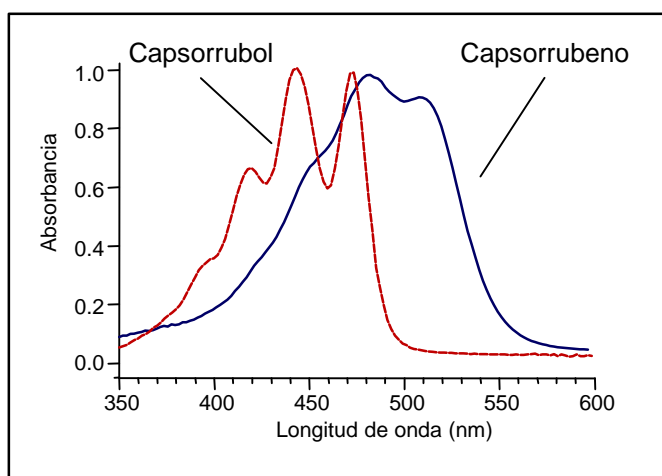


Figura 52. Prueba de grupo funcional carbonilo. (Ejemplo: modificación del espectro de absorción de capsorrubeno por reducción con NaBH_4 en etanol (conversión en capsorrubol)).

Grupos hidroxilos. Los alcoholes se convierten en ésteres por reacción con los ácidos carboxílicos, cloruros de ácido y anhídridos de ácido (**Figura 53**). Al pigmento disuelto en 2 mL de piridina se le añade 0.2 mL de anhídrido acético, se deja reaccionar durante 12 horas en la oscuridad. La reacción se detiene añadiendo agua y transfiriendo a éter de petróleo. El número de ésteres que se forman, según que los alcoholes sean simétricos o no, dan una idea del número de grupos hidroxilos que contiene la molécula, tras examinarlos por TLC ó HPLC. La presencia de un sólo grupo hidroxilo da lugar a un único derivado acetilado. Si están presentes dos grupos hidroxilos el resultado es un

derivado diacetilado y uno o dos derivados monoacetilados, dependiendo de que los grupos hidroxilos sean o no simétricos. Los derivados esterificados presentan menor polaridad por lo que en cromatografía en fase reversa eluirán con posterioridad al pigmento libre. Realizando esta prueba sobre pigmentos en distinto grado de esterificación podremos conocer como es dicha esterificación, es decir, no esterificado, monoesterificado o totalmente esterificado. La esterificación no modifica el cromóforo del pigmento y por lo tanto tampoco lo hace su espectro de absorción UV-visible.

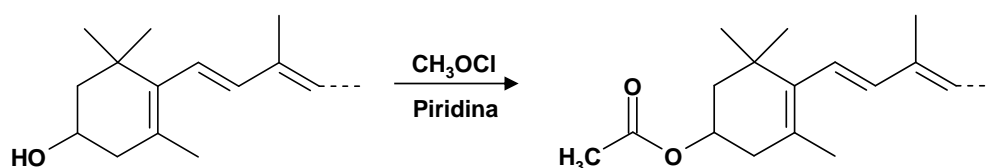


Figura 53. Esquema de la reacción de acetilación (esterificación) de un grupo hidroxilo en la posición 3 de un anillo β - terminal.

4.4.5. Aislamiento y purificación de patrones de pigmentos.

Son escasos los pigmentos carotenoides que se encuentran disponibles de forma comercial, por lo que los patrones deben ser preparados en el laboratorio mediante su aislamiento y purificación a partir de fuentes naturales o por síntesis parcial. Estos patrones tiene una doble finalidad, por un lado su uso como estándares para identificación y por otro como compuestos de referencia para la preparación de rectas de calibrado.

El aislamiento y purificación de patrones se suele realizar a partir de fuentes naturales (frutos y vegetales) en las cuales los pigmentos objeto de aislamiento se presentan en concentraciones altas y preferiblemente como compuesto mayoritario. En el presente trabajo luteína y β -caroteno fueron aislados a partir hojas de espinaca (*Spinacia oleracea* L.), mientras que zeaxanteno se obtuvo de frutos maduros de pimiento rojo (*Capsicum annuum* L.). El aislamiento de patrones pasa por la preparación de un extracto concentrado de espinaca y pimiento rojo a partir de 100 gramos de material vegetal. El extracto disuelto en éter dietílico se saponifica con KOH-MeOH 10% (p/v) durante 2 horas. Transcurrido ese tiempo se añade disolución de NaCl 10% (p/v), y se lava repetidas veces con agua destilada hasta neutralidad. El extracto etéreo se filtra por lecho de Na_2SO_4 anhidro, y se evapora a sequedad en rotavapor a temperatura inferior a 30°C . El residuo seco se disuelve en 10 mL de acetona constituyendo el extracto concentrado utilizado con fines de aislamiento y purificación de patrones de pigmentos. La separación y aislamiento de los pigmentos se realiza mediante separación cromatográfica en TLC (thin layer chromatography) sobre placas de Silica gel 60GF, utilizando

como líquido de desarrollo la mezcla éter de petróleo (65-95°C)/acetona/dietilamina (10:4:1) (Mínguez Mosquera y Garrido Fernández, 1989). En estas condiciones es posible aislar β -caroteno ($R_f=1.00$) y luteína ($R_f=0.41$) del extracto de espinacas, y zeaxanteno ($R_f=0.40$) del extracto de pimiento rojo. Los pigmentos se purifican mediante recromatografía en las mismas condiciones en las que se han obtenido, y finalmente se comprueba la pureza mediante análisis por HPLC en las condiciones que se describen a continuación. Así mismo, se tuvieron que usar otros patrones de carotenoides (α -caroteno, 9'-*cis*-neoxanteno, violaxanteno, anteraxanteno) y clorofilas (clorofila *a* y clorofila *b*), para lo que se hizo uso de los existentes en la colección de pigmentos de nuestro grupo de investigación, los cuales han sido aislados e identificados de fuentes naturales siguiendo protocolos similares al que hemos descrito (Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez, 1993; Mínguez-Mosquera *et al.* 1997). La concentración de las soluciones stock se determina espectrofotométricamente utilizando los correspondientes coeficientes de absorción específica (Tabla 3).

Tabla 3. Coeficientes de extinción específico ($A_{1cm}^{1\%}$) empleados para la cuantificación de las soluciones patrón de pigmentos de referencia.

Pigmento	$A_{1cm}^{1\%}$	λ_{max} (nm)	Disolvente
<i>Carotenoide</i>			
Luteína	2550	448	Etanol
Zeaxanteno	2348	448	EPL*
9'- <i>cis</i> -Neoxanteno	2243	438	Etanol
Violaxanteno	2550	440	Etanol
Anteraxanteno	2350	446	Etanol
β -Caroteno	2592	448	EPL
<i>Clorofilico</i>			
Clorofila <i>a</i>	840	430	Acetona
Clorofila <i>b</i>	1450	450	Acetona

* EPL. Éter de petróleo ligero 40-60

4.4.6. Separación y cuantificación de pigmentos mediante HPLC.

4.4.6.1. Método rutinario para la separación y cuantificación de pigmentos presentes en granos y harinas de cereal mediante HPLC en fase reversa C18.

El análisis de pigmentos carotenoides mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se llevó a cabo utilizando el método desarrollado por Mínguez-Mosquera

y Hornero-Méndez (1993) con algunas adaptaciones (Atienza *et al.*, 2007b). El sistema cromatográfico estuvo compuesto de una bomba cuaternaria Waters 2695 Alliance y un detector de diodos Waters 2998, controlado con la estación de datos Empower2 software (Waters Cromatografía, S.A., Barcelona) (**Figura 54**). La separación se llevó a cabo empleando una columna analítica de fase reversa Mediterranea SEA18 (20×0.46 cm d.i., 3 µm; Teknokroma, Barcelona) a la que se colocó una precolumna del mismo material (1×0.46 cm d.i.). La separación se realizó mediante un gradiente de elución binario empleando acetona (eluyente A) y agua desionizada (eluyente B) con una composición inicial de 75% de acetona. Dicha composición varió linealmente hasta 95% de acetona en 10 minutos, y posteriormente hasta 100% de acetona en 2 minutos, manteniendo dicha composición durante 10 minutos adicionales, tras lo cual se restituyen las condiciones iniciales (75% acetona) en 5 minutos. La **Tabla 4** resume el gradiente de elución empleado de forma rutinaria para el análisis de carotenoides en granos y harinas de cereal. De manera análoga, la **Tabla 5** muestra el gradiente de elución utilizado para el análisis de los pigmentos cloroplásticos (clorofilas y carotenoides) en las muestras de granos en desarrollo. El flujo de elución fue de 1 mL/min, y el volumen de inyección se fijó en 10 o 20 µL, en función de la concentración aparente de la muestra analizada. La columna se mantuvo termostatzada a 25°C, y el compartimento de muestras se refrigeró a 15°C. La detección se realizó a 450 nm, y en todo momento se adquirió el espectro de absorción UV-visible en el rango 350-700 nm (1.2 nm de resolución, 10 espectros/segundo). En el caso de las muestras de granos en desarrollo la detección se realizó de forma simultánea a 430 y 450 nm, al objeto de cuantificar adecuadamente las clorofilas y carotenoides como violaxanteno y 9'-*cis*-neoxanteno. La cuantificación de cada pigmento se realizó mediante el método del patrón externo (luteína, zeaxanteno, β-caroteno, anteraxanteno, 9'-*cis*-neoxanteno, violaxanteno, clorofila *a* y clorofila *b* patrón). Las curvas de calibrado fueron preparadas utilizando nueve niveles de concentración en el rango 0.5-30.0 µg/mL, y realizando cada inyección por triplicado. De manera análoga, se preparó una curva de calibrado de β-apo-8'-carotenal que en algunos experimentos fue utilizado como patrón interno. La **Tabla 6** muestra las curvas de calibrado para cada pigmento con indicación de los límites de detección (**LOD**) y cuantificación (**LOQ**), así como la longitud de onda de detección empleada. La cuantificación de las formas esterificadas de luteína fue realizada empleando el calibrado de luteína libre, ya que la esterificación con ácidos grasos no modifica las propiedades cromofóricas de los carotenoides. En relación a las xantofilas esterificadas, Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez (1994b) demostraron que la cromatografía mediante HPLC en fase reversa es posible distinguir tres fracciones de xantofilas en función del grado de esterificación, es decir xantofilas libres (L),

monoesterificadas (ME) y diesterificadas (DE). Para la cuantificación de las fracciones esterificadas, los picos correspondientes a dichas fracciones se integraron conjuntamente y se les aplicó la recta de calibrado obtenida con luteína patrón. Los isómeros *cis* de luteína fueron cuantificados utilizando la curva de calibrado del all-*trans*-luteína. De manera análoga, la cuantificación de α -caroteno se realizó con la curva de luteína, debido a que comparten el mismo cromóforo, previa corrección de los factores de respuesta mediante los pesos moleculares de ambos compuestos.



Figura 54. Equipo de cromatografía líquida de alta resolución (Waters 2695 Alliance) con detector espectrofotométrico DAD UV-visible (Waters 2998).

Tabla 4. Gradiente de elución binario empleado para el análisis rutinario de carotenoides en granos y harinas de cereal mediante HPLC en fase reversa C18.

Tiempo (min)	%A Acetona	%B Agua desionizada	Curva*
Inicial	75	25	
10	95	5	Lineal (6)
12	100	0	Lineal (6)
22	100	0	Lineal (6)
27	75	25	Lineal (6)

*El número se corresponde con el catálogo de curvas de gradientes de los equipos de cromatografía Waters.



Tabla 5. Gradiente de elución binario empleado para el análisis de los pigmentos cloroplásticos (clorofilas y carotenoides) en las muestras de granos en desarrollo mediante HPLC en fase reversa C18.

Tiempo (min)	%A Acetona	%B Agua desionizada	Curva*
Inicial	75	25	
10	95	5	Lineal (6)
17	95	5	Lineal (6)
20	100	0	Convexa (1)
28	100	0	Convexa (1)
33	75	25	Convexa (1)

*El número se corresponde con el catálogo de curvas de gradientes de los equipos de cromatografía Waters.

Tabla 6. Curvas de calibrado para la cuantificación por HPLC-DAD de los pigmentos cloroplásticos. Límites de detección (LOD), límites de cuantificación (LOQ) y longitud de onda de detección.

Pigmento	λ detección (nm)	Curva de calibrado ($y=ax$)	R^2	LOD** (pg)	LOQ*** (pg)
<i>Carotenoide</i>					
Luteína	450	$y= 13234 x$	0.9989	23	70
Zeaxanteno	450	$y= 9961 x$	0.9918	30	92
9'-cis-Neoxanteno	450	$y= 6336 x$	0.9902	48	145
Violaxanteno	450	$y= 8939 x$	0.9907	34	103
Anteraxanteno	450	$y= 9872 x$	0.9923	31	93
β -Caroteno	450	$y= 11756 x$	0.9995	26	78
β -apo-8'-carotenal	450	$y= 10456 x$	0.9928	29	88
<i>Clorofilico</i>					
Clorofila <i>a</i>	430	$y= 2798 x$	0.9964	109	329
Clorofila <i>b</i>	450	$y= 4707 x$	0.9982	64	195

* $y = ax$; y =Área de pico, a =factor de respuesta (pendiente), x =cantidad de pigmento inyectada (ng). Las curvas de calibrado fueron obtenidas por el método de mínimos cuadrados ponderado y forzando por el origen ($b=0$).

**LOD; Límite de detección (Calculado como 3.33 S/N (relación señal ruido) según ICH, 2005).

*** LOQ; Límite de cuantificación (Calculado como 10 S/N (relación señal ruido) según ICH, 2005)



4.4.6.2. Análisis de xantofilas libres y esterificadas mediante HPLC en fase reversa C30 y espectrometría de masas (HPLC-MS-(APCI))

Al objeto de identificar la naturaleza de la esterificación de las xantofilas presentes en las variedades de trigo y tritordeum estudiadas se hizo uso de la técnica de espectrometría de masas acoplada a HPLC y espectroscopia de absorción UV-visible (HPLC-DAD-MS). Para ello se dispuso de una bomba cuaternaria Waters 2695 Alliance acoplado en línea un detector de diodos Waters 996 seguido de un detector de espectrometría de masas Micromass ZMD4000 (Manchester, UK) dotado de una sonda APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation), y controlado con la estación de datos MassLynx 3.2 software (Waters Cromatografía, S.A., Barcelona) (**Figura 55**). La separación se llevó a cabo empleando el método propuesto por Breithaupt y Schwack (2000), utilizando una columna analítica de fase reversa YMC C30 (250 × 0.46 cm d.i., 5 µm; YMC Europe GMBH, Dinslaken, Alemania) y con ligeras modificaciones de las condiciones cromatográficas originales. El método utiliza un gradiente de elución ternario empleando metanol (eluyente A), metil-tert-butil eter (eluyente B) y agua desionizada (eluyente C) con una composición inicial de 81:15:4 (v/v/v). Dicha composición varía linealmente hasta 45:53:2 (v/v/v) en 45 minutos, y posteriormente hasta 9:91:0 (v/v/v) en 15 minutos, es decir un tiempo total de análisis de 60 minutos (**Tabla 7**). La vuelta a las condiciones iniciales se realiza en 5 minutos. El flujo de elución fue de 1 mL/min, y el volumen de inyección 20 µL, manteniéndose la columna y el compartimento de muestras a 25 y a 15°C, respectivamente. La detección mediante espectroscopia UV-visible se realizó a 450 nm, y el espectro de absorción se adquirió en el rango 250-700 nm (1.2 nm de resolución, 10 espectros/segundo). Las condiciones de espectrometría de masas fueron: modo positivo (+); temperatura del bloque (source) 150°C; temperatura de la sonda APCI 400°C; voltaje de la corona 3.7 kV, lentes HV 0.5 kV, y voltaje del cono 30 V. Los flujos de nitrógeno como gas de desolvatación y de cono fueron 350 y 75 L/h, respectivamente. El espectro de masas de los carotenoides se adquirió en el rango m/z 300-1200.



Figura 55. Equipo de cromatografía líquida de alta resolución (Waters 2695 Alliance) acoplado en serie a un detector DAD UV-visible de diodos (Waters 996) y a un detector de espectrometría de masas (Micromass ZMD4000) con sonda APCI.

Tabla 7. Gradiente de elución ternario empleado para el análisis de los pigmentos carotenoides (libres y esterificados) mediante HPLC en fase reversa C30 y espectrometría de masas (HPLC-MS- (APCI)).

Tiempo (min)	%A Agua desionizada	%B Metanol	%C MTBE	Curva
Inicial	4	81	15	
45	2	45	53	Lineal (6)
60	0	9	91	Lineal (6)
65	4	81	15	Lineal (6)

*El número se corresponde con el catálogo de curvas de gradientes de los equipos de cromatografía Waters.

4.5. Análisis de ácidos grasos mediante cromatografía de gases (GC).

El análisis de la composición de ácidos grasos de las muestras estudiadas se realizó mediante el método de Garcés y Mancha (1993), el cual permite realizar simultáneamente la extracción de los lípidos y la hidrólisis y derivatización de los ácidos grasos (libres y combinados) a sus correspondientes ésteres metílicos (FAMES; Fatty acid methyl esters) para ser analizados por cromatografía de gases (GC). En nuestro caso este método es especialmente conveniente dado el pequeño tamaño de la muestra y el bajo contenido en lípidos de los cereales (inferior al 2%). Parte del presente trabajo ha incluido la adaptación del citado método para ser empleado en el análisis de ácidos grasos en trigos y



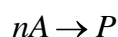
tritordeum (aplicable al resto de cereales), el cual se describe a continuación. Medio gramo (0.5 g) de harina se coloca en un tubo de vidrio de 18 mL con tapón de rosca y junta de teflón, y se añaden 1.65 mL de la mezcla metanol:tolueno:2,2-dimetoxipropano (DMP):H₂SO₄ (39:20:5:2, v/v/v/v), 0.85 mL de heptano conteniendo 0.05% de BHT, y 100 µL de solución de ácido heptadecanoico (C17:0, patrón interno) de concentración 20.0 mg/mL. El tubo se purga con N₂, y se agita vigorosamente en vortex durante 1 minuto, y seguidamente se mantiene a 85°C en bloque calefactor durante 2 horas. Cuando la reacción finaliza, el tubo se deja enfriar a temperatura ambiente, y se transfieren 0.5 mL de la fase superior, conteniendo los FAMES, a un vial de cromatografía para ser analizados por GC. La separación y cuantificación de los FAMES se realizó usando un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A dotado de un detector de ionización de llama (FID) y un inyector automático (**Figura 56**). La separación se realizó con una columna capilar (Supelcowax 10, 30m × 0.32mm, 0.25µm film), y las condiciones de trabajo fueron: temperatura del inyector, 250°C; temperatura del detector FID, 260°C; gas portador, Helio (flujo lineal constante, 1.75 mL/min); volumen de inyección, 1 µL (relación de split 1:50). La temperatura de horno se mantiene inicialmente a 145°C, cambiando a una velocidad de 15°C/min hasta 230°C, temperatura que se mantiene constante durante 10 minutos, para volver a las condiciones iniciales. La cuantificación se realiza mediante calibrado frente a patrón interno (ácido heptadecanoico, C17:0), y asumiendo para todos los ácidos grasos el mismo factor de respuesta relativo (Fr=1). La composición de ácidos grasos se expresa tanto en términos relativos (%) como absolutos (µg/g). La identificación de los ácidos grasos se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención relativos de los picos cromatográficos con los de mezclas patrones de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME Supelco 37 Mix, ref. 47885-U) y FAME Mix C8-C22, ref. 18920), así como inyectando muestras reales de composición conocida (aceite de oliva virgen, y aceite de girasol).



Figura 56. Equipo de cromatografía de gases (Agilent 7890A) dotado de detector de ionización de llama (FID) para en análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES).

4.6. Cálculos de parámetros cinéticos.

La expresión de la ecuación de velocidad fue obtenida empleando el método basado en el uso de las ecuaciones de velocidad integradas para un reactivo (Upadhyay, 2006). Para la siguiente reacción general:



si C_0 es la concentración inicial del reactivo A, C_t la concentración a cualquier tiempo t (meses), k es la constante de velocidad de la reacción, en nuestro caso de degradación (meses^{-1}) y n es el orden de la reacción, la expresión diferencial de velocidad (1) viene dada como

$$-dC/dt = k C^n \quad (1)$$

que reordenando resulta en la expresión (2):

$$-dC/C^n = k dt \quad (2)$$

la cual puede ser integrada, tomando como límites de integración C_0 (concentración inicial) y C_t (concentración transcurrido un tiempo t).



$$\int dC/C^n = -k \int dt \quad (3)$$

En función del valor que tome el orden de reacción (n) la expresión de la dependencia de la velocidad de reacción será distinta. En la **Tabla 8** se muestran las expresiones de la velocidad de reacción, su forma integrada y lineal, así como los parámetros cinéticos para reacciones de orden 0 y 1.

Tabla 8. Expresión de la velocidad de reacción en función del orden de reacción (n) y parámetros cinéticos derivados.

	Expresión de velocidad	Forma integrada $y = mx$	Representación gráfica	Vida media $t_{1/2}$	D $t_{1/10}$
Orden 0			$C - C_0$ vs t		
$n=0$	$-dC/dt = k C^0 = k$	$C - C_0 = -k t$	Pendiente = $-k$	$t_{1/2} = C_0/2k$	$t_{1/10} = 0.9 C_0/k$
Orden 1			$\ln(C/C_0)$ vs t		
$n=1$	$-dC/dt = k C^1 = k C$	$\ln(C/C_0) = -k t$	Pendiente = $-k$	$t_{1/2} = \ln 2/k$	$t_{1/10} = \ln 10/k$

Según se desprende de la tabla, para ambos órdenes la constante de velocidad (k) a una temperatura dada (T) es la pendiente de las respectivas rectas indicadas. Se investigó el ajuste para cinética de orden cero ($n=0$) y primer orden ($n=1$) a los datos experimentales correspondientes a cada pigmento presente en los dos tipos de cereales, trigos y tritordeum, al objeto de determinar el mejor modelo. A su vez empleando la expresión de velocidad integrada correspondiente al modelo de mejor ajuste (generalmente de primer orden) se calcularon los parámetros de vida media ($t_{1/2}$) y D ($t_{1/10}$) siendo el tiempo que debe de transcurrir para que la concentración inicial de un determinado compuesto se reduzca respectivamente a la mitad y a la décima parte.

La dependencia de la velocidad de reacción con la temperatura fue cuantificada mediante la ecuación de Arrhenius (4):

$$k = k_0 \exp (-E_a/RT) \quad (4)$$

o en su expresión lineal, tras tomar logaritmos naturales (Ln)

$$\text{Ln}k = \text{Ln}k_0 - E_a/RT \quad (5)$$

donde E_a es la energía de activación de la reacción (kJ/mol), $\text{Ln}k_0$ es el factor pre-exponencial, R es la constante de los gases ($8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) y T es la temperatura (en grados Kelvin). Los parámetros de E_a y $\text{Ln}k_0$ fueron obtenidos gráficamente de las representaciones de $\text{Ln}k$ frente al inverso de la temperatura ($1/T$), siendo ambos parámetros respectivamente el numerador de la pendiente y la ordenada en el origen de la ecuación (5). Finalmente el valor del parámetro z , definido como el incremento de temperatura necesario para conseguir un aumento de 10 veces en la constante de velocidad inicial, fue calculado también gráficamente desde el inverso de la pendiente de la representación de $\text{Ln}k$ frente a la temperatura (T), según la relación $z=z' \text{ Ln}10$, donde z' es el inverso de la pendiente.

4.7. Análisis de expresión de genes carotenogénicos.

4.7.1. Extracción y purificación de RNA total.

El RNA se extrajo de acuerdo con el protocolo descrito por Pistón *et al.* (2006) con algunas adaptaciones (Pistón comunicación personal) y se resuspendieron en 60 μl de agua mili-Q estéril. Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su uso. La concentración y la calidad del RNA se determinaron espectrofotométricamente (NanoDrop ND-1000; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). La integridad se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y tinción con bromuro de etidio.

4.7.2. Síntesis de cDNA.

El cDNA se obtuvo a partir 2 μg de RNA total utilizando la retrotranscriptasa M-MLV (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) con primer oligonucleótido (dT) en un volumen total de 20 μl de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Se comprobó la ausencia de contaminación con DNA genómico utilizando una pareja de cebadores que amplifican un intrón del gen *Psy1* (Atienza *et al.*, 2007d).



4.7.3. PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR).

4.7.3.1. Diseño de cebadores.

Para cada gen candidato se diseñaron cebadores para amplificar los tres homeólogos (genomas A, B y H^{ch}) a partir de las secuencias parciales de estos genes de *H. chilense* (Rodríguez-Suárez y Atienza, 2012) y de otras gramíneas disponibles en el NCBI. Los alineamientos se realizaron con el programa Edialign (<http://emboss.sourceforge.net/index.html>). Se utilizó el programa Primer3plus (Untergasser *et al.*, 2007) para diseñar cebadores en las zonas conservadas y en los exones siempre que fue posible con los siguientes criterios: longitud (18-22 pb), tamaño de amplicón (120 pb aproximadamente); temperatura de hibridación (60°C). Los cebadores diseñados fueron utilizados para la amplificación de los genes candidatos a partir de DNA genómico y cDNA, para comprobar su especificidad, siguiendo las condiciones descritas por Rodríguez-Suárez *et al.* (2012). La búsqueda de identidad de secuencias fue desarrollada en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando BLAST.

4.7.3.2. Análisis de expresión mediante qPCR a tiempo real.

La qPCR se realizó siguiendo la metodología descrita por Giménez *et al.* (2011). Brevemente, se utilizó un equipo ABI PRISM 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA) en combinación con el uso de la tecnología SYBR® Green I. La mezcla de reacción se realizó siguiendo las indicaciones descritas en Rodríguez-Suárez *et al.*, (2011a). Para cada reacción se utilizó 5 µl de solución de cDNA en un volumen de reacción de 25 µl conteniendo 12.5 µl de 2x FastStart Universal SYBR Green Master (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), 1 µl de cebadores específicos para cada gen (225 µM) y 6.5 µl de agua. El tamaño de los amplicones oscilaba entre 97 y 120 pb (**Tabla 7**). Las condiciones de la reacción fueron 95°C durante diez minutos seguido de 40 ciclos de amplificación a 95°C durante 15 segundos y 60°C durante un minuto. Todas las reacciones fueron desarrolladas en placas multipocillos de 96 con película adhesiva óptica MicroAmp (Applied Biosystems). Para cada genotipo se utilizaron cuatro réplicas biológicas (2 parcelas de campo x 2 muestras distintas en cada surco). Para cada réplica biológica se utilizaron 2 diluciones (1 y 1:4) que tuvieron la consideración de réplicas técnicas. Con respecto a cada placa de PCR, se incluyeron controles negativos de mezcla de reacción y de agua para descartar la existencia de contaminaciones y la amplificación inespecífica de los cebadores. Así mismo, se incluyó una serie de muestras repetidas en todas las placas (inter-run calibrator) con el objeto de comprobar la existencia de variaciones entre placas

para un mismo gen. La identidad de los fragmentos amplificados fue confirmada al secuenciar los productos de PCR amplificados para cada pareja de primers en *H. chilense*.

Se determinó la eficiencia de cada pareja de primers utilizando el programa de análisis de datos de PCR cuantitativa LinRegPCR (versión 11.0) (Ruijter *et al.* 2009) empleando el dato de fluorescencia como dato de origen. La expresión de los genes candidatos se determinó utilizando la fórmula $N_0 = 0.2/E^{Cq}$, donde E es la eficiencia de cada primer; Cq es el número de ciclos requeridos para alcanzar 0.2 unidades de fluorescencia. La eficiencia de PCR fue determinada para cada gen y especie.

Para cada muestra, se obtuvo la expresión normalizada con respecto a los genes RLI(a), CDC(a) y ADP-RF(m) (Vandesompele *et al.* (2002). Para ello se utilizaron los cebadores desarrollados por Giménez *et al.* (2011) y se comprobó la estabilidad de estos genes a lo largo del desarrollo del grano con el programa geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002). Por último, se inspeccionaron las curvas de disociación de los amplicones resultantes de la qPCR, comprobándose la existencia de una única banda del tamaño esperado para cada pareja de cebadores.

Tabla 9. Relación de cebadores utilizados en la amplificación por qPCR a tiempo real.

Gen	Secuencia	Orientación	T ^m * (°C)	Amplicón (bp)
<i>HDR</i>	5'-CACAACCCACGGTCAAC-3'	Fw	60.86	120
	5'-AAATGCAGGCAAGACAACAA-3'	Rev	59.32	
<i>PDS</i>	5'-CCCTGACGAGTTATCCATGC-3'	Fw	60.48	103
	5'-TTCAGGAGGATTACCATCCAA-3'	Rev	59.37	
<i>GGPPS1</i>	5'-GAGGCCTCAGTGGTTATTGG-3'	Fw	59.55	97
	5'-GGAACAGCAACCCAATTGAT-3'	Rev	59.80	
<i>PSY1</i>	5'-CATAGGCCCTCTTGGTGAAG-3'	Fw	61.06	115
	5'-GGTGGGAGAAGAGATTAGAGGA-3'	Rev	59.69	
<i>PSY2</i>	5'-GGTGGGAGAAGAGATTAGAGGA-3'	Fw	58.81	136
	5'-TCAAGCCTCATCCCTTCAAT-3'	Rev	59.63	
<i>DXR</i>	5'-TGTTTGGTGCTGAATATGATGA-3'	Fw	59.04	100
	5'-AGCTGAGCCAGGACAGATGA-3'	Rev	61.12	
<i>εLCY</i>	5'-CTTTGGATTGGCCTTGATAAT-3'	Fw	58.08	112
	5'-AAGCGTCGAACCAAGGAATC-3'	Rev	61.51	
<i>βLCY</i>	5'-TCGACATCGACAAGATGCTC-3'	Fw	60.36	108
	5'-GCATGGCGTAGAGGAAGGT-3'	Rev	58.90	
<i>ZDS</i>	5'-TGGATGGGTTACTGAAGTCCA-3'	Fw	59.95	118
	5'-TGCAAGGTCTGAAAAACAGG-3'	Rev	60.23	

* T_m: Temperatura de hibridación.

4.8. Tratamientos de los resultados y análisis estadístico.

Los datos de composición de pigmentos totales e individuales se expresan como la media y el error estándar. Los resultados obtenidos fueron procesados y representados con los programas Microsoft Excel 2003 y 2010. Cuando fue necesario, la existencia de diferencias significativas entre las medias se determinó mediante test ANOVA de una vía, seguido de un test de comparación de medias post-hoc utilizando el test de Duncan para un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$), utilizando el programa STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc.).





5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1. Caracterización de la composición carotenoide en granos de tritordeum y trigo duro.

Los trabajos pioneros de Zechmeister y Cholnoky (1940) sobre caracterización de los pigmentos carotenoides presentes en la harina de trigo mediante técnicas cromatográficas (en desarrollo por aquel tiempo) pusieron de manifiesto que la “xantofila”, nombre genérico dado inicialmente a luteína ($C_{40}H_{56}O_2$), era el pigmento carotenoide principalmente responsable del color amarillo de las harinas (más del 70% de la composición se correspondía con luteína) en contraposición con estudios anteriores que describían a β -caroteno ($C_{40}H_{56}$) como el pigmento mayoritario (Wesener y Teller, 1911).

Aunque los resultados de Zechmeister y Cholnoky (1940) fueron concluyentes, también fueron numerosos los investigadores que siguieron asumiendo que β -caroteno era el principal pigmento carotenoide presente en la fracción lipídica de las harinas de trigo, y en consecuencia son frecuentes las referencias bibliográficas, durante la primera mitad del siglo XX, a los granos y harinas de trigo, y de cereales en general, como una fuente importante de provitamina A. Esta circunstancia ha provocado que incluso trabajos recientes asuman tal circunstancia (Santra *et al.*, 2003, 2005; Beleggia *et al.*, 2010, 2011). A todo esto ha contribuido el extensivo y poco controlado uso de métodos oficiales para medir el contenido de pigmentos carotenoides y color de determinados cereales y productos derivados (trigo duro, semolina, pasta, etc.), en los cuales el color amarillo es un importante atributo de calidad que condiciona la aceptación por parte de los consumidores (Lepage y Sims, 1968; Johnston *et al.*, 1983; Liu *et al.*, 1996; Trono *et al.*, 1999; Troccoli *et al.*, 2000; Hentschel *et al.*, 2002; Ram *et al.*, 2002; Royo *et al.*, 2009). El método oficial más ampliamente utilizado es el propuesto por la *American Association of Cereal Chemists* (AACC) y denominado *Yellow Pigment Content* (AACC Method 14-50, 2000), mediante el cual y en base a estimaciones derivadas de medidas espectrofotométricas, se expresa el contenido carotenoide (definido como *Yellow Pigment Content*, YPC) como equivalentes de β -caroteno por gramo de muestras. Adaptaciones más recientes de dicha metodología expresan los resultados en base a contenido de luteína (Burkhardt y Böhm, 2007), pero aún no han sido incorporadas al método oficial. Por todo ello, urge una revisión de los datos existentes en la bibliografía al objeto de contribuir a un mejor conocimiento de la presencia de pigmentos carotenoides en cereales, facilitando la comprensión de las rutas metabólicas involucradas en su biosíntesis y permitiendo el desarrollo de herramientas para la mejora de las variedades mediante selección dirigida.

Como ya se ha comentado en el apartado de *Antecedentes* de la presente memoria, son pocos los trabajos que han abordado el estudio detallado del perfil de carotenos y



xantofilas en cereales, y en la mayoría de los casos se centran principalmente en el trigo panadero (*T. aestivum*), y en menor medida en trigo duro (*T. turgidum*) y maíz (*Z. mays*). La aplicación de técnicas modernas de análisis cromatográfico, principalmente HPLC acoplado a detectores espectrofotométricos UV-visible (DAD) y de espectrometría de masas (MS), ha permitido concluir en la totalidad de los trabajos que luteína (3,3'-diol- β,ϵ -carotene) es el pigmento carotenoide mayoritario en cereales, estando a menudo acompañada de zeaxanteno (3,3'-diol- β,β -carotene) y β -caroteno (β,β -carotene), aunque éstos últimos en concentraciones menores (Lepage y Sims, 1968; Hentschel *et al.*, 2002; Adom *et al.*, 2003; Hidalgo *et al.*, 2006; Leenhardt *et al.*, 2006a).

En el caso de tritordeum, el único estudio realizado al respecto es el trabajo llevado a cabo recientemente por nuestro grupo de investigación en colaboración con el Instituto de Agricultura Sostenible del CSIC (Atienza *et al.*, 2007b). En dicho estudio se analizó por primera vez la composición individual de carotenoides en un amplio número de líneas de tritordeum (53 líneas hexaploides de tritordeum, tanto primarios como secundarios) y se comparó con el perfil correspondiente de 7 variedades comerciales de trigo duro, encontrándose que el contenido carotenoide en tritordeum (2.6-9.4 $\mu\text{g/g}$) era del orden de 5 a 8 veces superior con respecto a trigo duro (0.7-1.8 $\mu\text{g/g}$), siendo en ambos casos luteína el carotenoide mayoritario. Debemos mencionar que dicho valor es también superior al contenido carotenoide total (1.6 $\mu\text{g/g}$; mayoritariamente β -caroteno) descrito para el endospermo de *Golden Rice*, variedad de arroz obtenida mediante ingeniería genética, y cuyo desarrollo ha suscitado tanto interés por las aplicaciones que puede tener para combatir la carencia de vitamina A en países en vías de desarrollo (Ye *et al.*, 2000). En este sentido, el uso y consumo de granos y harinas de tritordeum podría ser complementario al de *Golden Rice*, puesto que el primero aportaría una fuente continuada de luteína, esencial para combatir enfermedades oculares como la degeneración macular (AMD), mientras que el segundo aportaría una fuente de provitamina A (β -caroteno).

Como aspecto diferenciador con respecto a otros cereales, cabe destacar que en el caso de tritordeum, una proporción apreciable de luteína se encuentra esterificada con ácidos grasos, mientras que en los trigos estudiados por nosotros la presencia de ésteres de xantofilas es mucho menor o está ausente. La presencia de ésteres de xantofilas, concretamente de luteína, en trigo y otros cereales ha sido observada y descrita en muy pocas ocasiones (Lepage y Sims, 1968; Farrington *et al.*, 1981; Kaneko *et al.*, 1995; Atienza *et al.*, 2007b), no existiendo información referente a la naturaleza y asignación estructural de las diferentes formas de esterificación.

Como ya se ha comentado, la presencia de ésteres de xantofilas está ampliamente estudiada en frutos carotenogénicos, sin embargo son escasos los estudios que mencionan la existencia de éstos compuestos en trigos y otros cereales (Farrington *et al.*, 1981; Lepage y Sims, 1968; Kaneko *et al.*, 1995). La naturaleza de los ácidos grasos involucrados en la esterificación de luteína en tritordeum ha sido objeto de estudio en el presente trabajo, discutiéndose más adelante.

Sorprendentemente, la presencia de ésteres de carotenoides con ácidos grasos ha sido a menudo obviada e incluso ignorada en multitud de investigaciones como consecuencia del uso de la hidrólisis alcalina (saponificación) como paso rutinario en el proceso de extracción y análisis de estos pigmentos. La saponificación de los extractos de carotenoides simplifica enormemente el análisis de estos pigmentos mediante HPLC al reducir las diferentes formas de esterificación a una sola, la forma libre, al tiempo que elimina los lípidos potencialmente interferentes con el proceso cromatográfico. Además, el empleo de la saponificación sin adoptar las precauciones adecuadas puede ocasionar la formación de artefactos e incluso la degradación de pigmentos, con la consecuente infravaloración del perfil carotenode. En consecuencia, hasta hace poco tiempo, la información relativa a la esterificación de xantofilas en frutos y vegetales ha sido muy escasa, aunque se debe insistir que se trata de la forma nativa mayoritariamente encontrada en frutos carotenogénicos (Britton, 1998). El proceso de esterificación de las xantofilas con ácidos grasos debe ser considerado como una parte importante del mecanismo utilizado por los vegetales para sobreacumular pigmentos carotenoides, en especial en frutos carotenogénicos y tejidos vegetales senescentes, participando de manera activa en la atracción de los animales que actúan como vehículos de semillas y polen (Hornero-Méndez y Mínguez-Mosquera, 2000; Howitt y Pogson, 2006). Además, la esterificación de xantofilas con ácidos grasos parece mejorar la estabilidad de estos pigmentos frente a los procesos termo-oxidativos que acontecen durante el procesado de los alimentos (Fu *et al.*, 2010), así como aumentar la biodisponibilidad de los mismos al incrementar la extractabilidad y solubilidad de los pigmentos en los lípidos de la dieta (Pérez-Gálvez y Mínguez-Mosquera, 2005).

Por todo ello, la correcta identificación de la naturaleza de los ésteres de carotenoides presentes en un amplio rango de especies vegetales es crucial para poder revelar los mecanismos que gobiernan el proceso biosintético que da lugar a la formación y acumulación de estos compuestos. En base a trabajos previos de nuestro grupo de investigación (Atienza *et al.*, 2007b), en la presente Tesis Doctoral se ha abordado la caracterización individual de los ésteres de xantofilas presentes en el endospermo de



tritordeum, incluyendo la asignación estructural de los regioisómeros que pudieran estar presentes.

5.1.1. Aislamiento e identificación de pigmentos.

Al objeto de realizar la caracterización comparada de la composición carotenoides de granos de trigo duro y tritordeum, se seleccionaron tres líneas avanzadas de tritordeum (HT609, HT621 y HT630) y tres variedades comerciales de trigo duro (Claudio, Don Pedro y Simeto), prestando especial atención a la caracterización de la naturaleza de la esterificación de las xantofilas, factor que parece ser determinante de la estabilidad de las xantofilas durante el procesado y almacenamiento de los granos y harinas.

Tal y como se ha descrito en la sección de *Materiales y Métodos*, la identificación de los pigmentos carotenoides se basó en el uso combinado de pruebas químicas y ensayos espectroscópicos (fundamentalmente espectroscopía UV-visible y de masas), así como el estudio de las propiedades cromatográficas de los pigmentos aislados, comparando los datos experimentales con los obtenidos con patrones puros y con la información existente en la bibliografía especializada.

Para identificar los pigmentos carotenoides en su forma nativa, se prepararon extractos directos de todas las variedades contempladas en este estudio, los cuales fueron analizados mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD) empleando el método desarrollado con anterioridad en nuestro laboratorio (Atienza *et al.*, 2007b) con ligeras adaptaciones. A modo ilustrativo, la **Figura 57** muestra los cromatogramas de HPLC correspondientes a los extractos directos obtenidos para la línea HT609 de tritordeum (**Figura 57A**) y para la variedad Simeto de trigo duro (**Figura 57B**), obteniéndose cromatogramas similares para el resto de muestras de tritordeum (HT621 y HT630) y trigo duro (Claudio y Don Pedro) estudiadas. Del análisis cualitativo de ambos cromatogramas se encontró una clara diferenciación en el perfil carotenoides entre trigo y tritordeum. Así, en los extractos de tritordeum se evidenció la presencia de picos cromatográficos, inicialmente no identificados, a tiempos de retención anteriores y posteriores a la zona de los carotenos (16-18 minutos) y que de manera tentativa fueron asignados como ésteres de xantofilas, tanto monoésteres como diésteres (éstos últimos en menor concentración). Por el contrario, en las muestras de trigo duro no se detectó la presencia de ésteres.

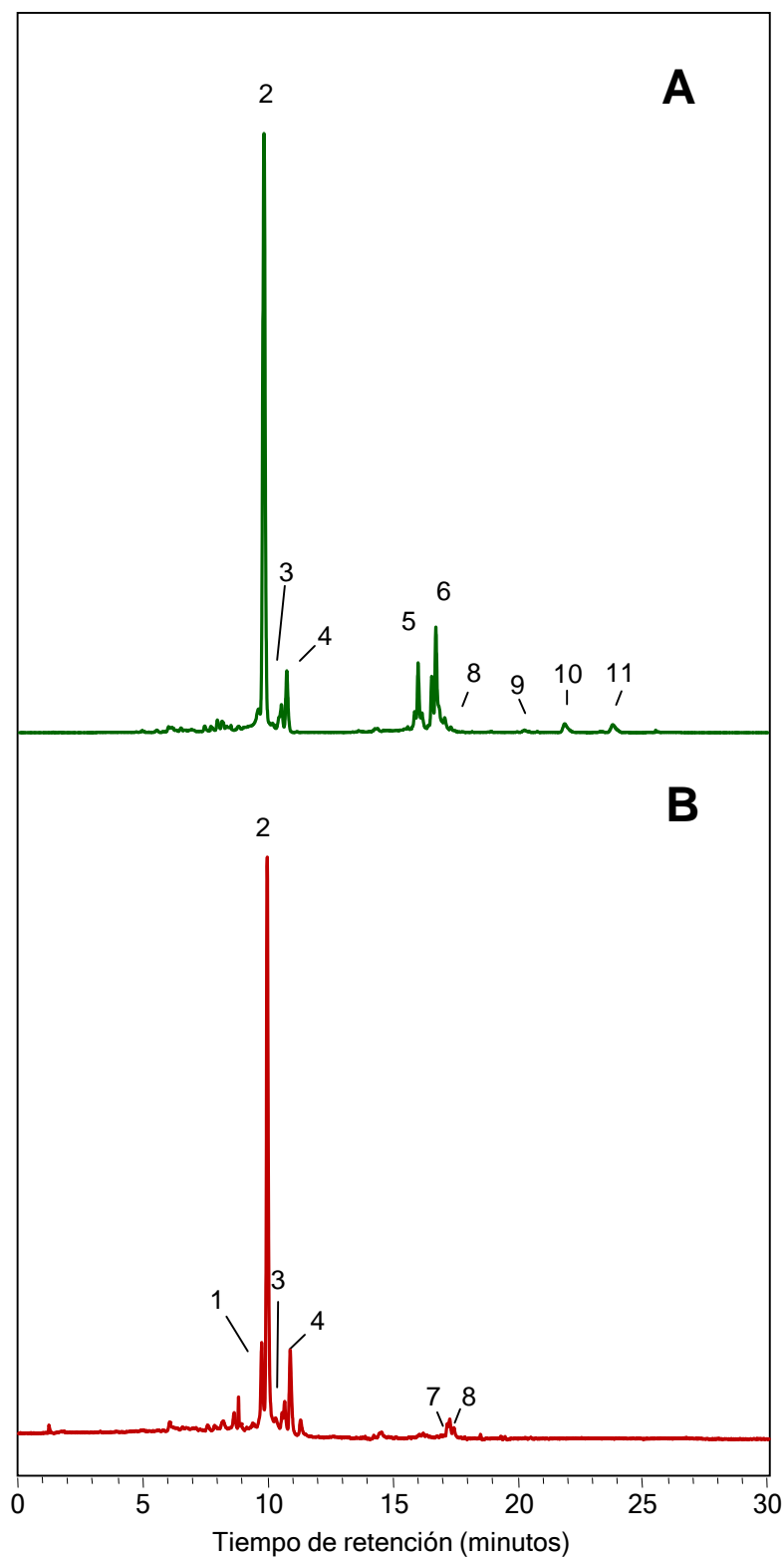


Figura 57. Cromatogramas de HPLC correspondiente a extractos directos de pigmentos carotenoides obtenidos de granos de tritordeum de la línea HT609 (A) y de trigo duro de la variedad Simeto (B). Ver **Tabla 10** para identidad de picos. Detección a 450 nm. Columna de fase reversa C18. Para resto de condiciones cromatográficas consultar la sección de *Materiales y Métodos*.



Al objeto de demostrar inequívocamente la presencia de ésteres de xantofilas, alícuotas de los extractos de tritordeum se sometieron a saponificación mediante tratamiento con KOH-MeOH al 10% (p/v). En la **Figura 58** se muestra el cromatograma resultante para la línea HT609, obteniéndose nuevamente cromatogramas similares para las otras dos líneas de tritordeum estudiadas (HT621 y HT630). Como resultado de la saponificación se observó la desaparición en el cromatograma de determinados picos (picos 5, 6, 9, 10 y 11), correspondientes a las xantofilas aciladas con ácidos grasos, y que tras la saponificación quedan como pigmentos libres. La identificación y asignación estructural de estos ésteres se discute más adelante, siendo este uno de los aspectos novedosos del presente trabajo de investigación. La no aparición de nuevos picos en el cromatograma obtenido tras la saponificación, y el aumento del área relativa del pico de luteína libre, sugiere que los ésteres presentes en tritordeum corresponden a luteína.

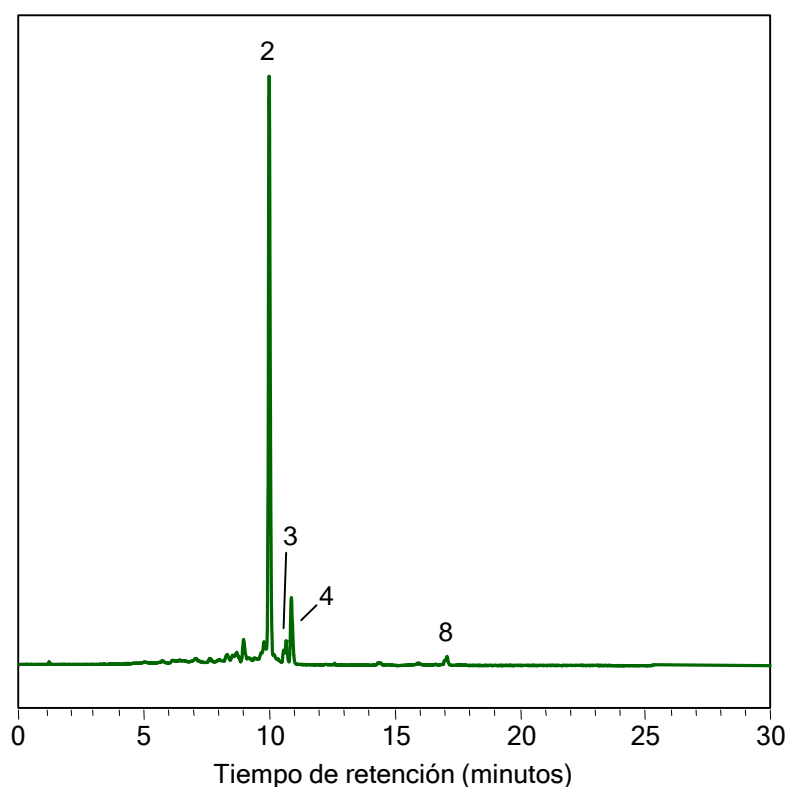


Figura 58. Cromatograma de HPLC correspondiente al perfil de pigmentos carotenoides resultante tras la saponificación con KOH-MeOH 10% (p/v) de un extracto de granos de tritordeum de la línea HT609 (ver **Tabla 10** para identidad de picos). Detección a 450 nm. Columna de fase reversa C18. Para resto de condiciones cromatográficas consultar la sección de *Materiales y Métodos*.



Como ya se ha demostrado previamente en nuestro laboratorio (Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez, 1994a,b), cuando se analiza un extracto directo de pigmentos carotenoides, es decir no saponificado, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) empleando como fase estacionaria una columna de fase reversa C18 (octadecilsililo) se observa un patrón de elución característico en cuanto a los ésteres de xantofilas se refiere, de tal modo que las formas parcialmente esterificadas (por ejemplo, monoésteres de luteína, de zeaxanteno y de capsanteno) eluyen a tiempos de retención inferiores a β -caroteno, mientras que las formas totalmente esterificadas (por ejemplo, diésteres de luteína, zeaxanteno y capsanteno, o monoésteres de β -criptoxanteno) son más retenidas que β -caroteno debido a su mayor apolaridad. Estudios en fase de desarrollo en nuestro laboratorio, nos han permitido comprobar que dicha regla es válida para xantofilas esterificadas con ácidos grasos con al menos 10 átomos de carbono (ácido laúrico, C10:0), y no más de 18 carbonos (ácido esteárico, C18:0), en su estructura, los cuales son los más habituales en vegetales (Delgado-Pelayo, Gallardo-Guerrero y Hornero-Méndez, 2013, en preparación). A modo de referencia el tiempo de retención (R_t) para β -caroteno en el sistema cromatográfico empleado fue de unos 17 minutos. Por lo tanto, siguiendo este razonamiento los picos **5** y **6** (eluyendo antes de β -caroteno) fueron asignados de manera preliminar y tentativa como monoésteres, mientras que los picos **9**, **10** y **11** lo fueron como diésteres.

En la **Tabla 10** se muestran las propiedades cromatográficas (HPLC), espectroscópicas (UV-visible) y químicas de los pigmentos carotenoides presentes en los extractos directos de tritordeum y trigo duro, así como la identidad de los mismos.

Tabla 10. Propiedades cromatográficas (HPLC), espectroscópicas (UV-visible y MS) y pruebas químicas de grupos funcionales de los principales carotenoides presentes en extractos directos de tritordeum y trigo duro.

Pico ^a	Carotenoide	Espectro UV-visible				Espectro MS (APCI+)	Prueba químicas de grupos funcionales ^d		
		Rt (min)	λ_{\max} (nm) en fase móvil	III/II (%)	A _B /II (%)	m/z (Abundancia relativa)	Carbonilos (BH ₄ Na)	5,6-epóxidos (HCl-EtOH)	Hidroxiolos (Acetilación)
1	all- <i>trans</i> -Zeaxanteno	9.62	(428), 454, 482	8	0	569 [M+H] ⁺ (100), 551 [M+H-18] ⁺ (12), 533 [M+H-18-18] ⁺ (2)	-	-	++
2	all- <i>trans</i> -Luteína	9.84	428, 448, 476	65	0	569 [M+H] ⁺ (5), 551 [M+H-18] ⁺ (100), 533 [M+H-18-18] ⁺ (2)	-	-	++
3	9- <i>cis</i> -Luteína 9'- <i>cis</i> -Luteína	10.53	330, 420, 442, 471	67	21	569 [M+H] ⁺ (7), 551 [M+H-18] ⁺ (100), 533 [M+H-18-18] ⁺ (3)	-	-	++
4	13- <i>cis</i> -Luteína 13'- <i>cis</i> -Luteína	10.75	330, 418, 441, 469	45	44	569 [M+H] ⁺ (6), 551 [M+H-18] ⁺ (100), 533 [M+H-18-18] ⁺ (2)	-	-	++
5	Luteína monoéster 1	16.01	424, 447, 476	65	-	- ^b	-	-	+
6	Luteína monoéster 2	16.72	424, 447, 476	64	-	- ^b	-	-	+
7	α -Caroteno	16.85	424, 448, 474	55	0	537 [M+H] ⁺ (100) ^c	-	-	-
8	β -Caroteno	17.05	(428), 452, 480	10	0	537 [M+H] ⁺ (100) ^c	-	-	-
9	Luteína diéster 1	20.27	424, 447, 476	65	-	- ^b	-	-	-
10	Luteína diéster 2	21.88	424, 447, 476	64	-	- ^b	-	-	-
11	Luteína diéster 3	23.80	424, 447, 476	64	-	- ^b	-	-	-

a. La numeración de los picos se corresponde con las Figuras 56 y 57.

b. Los espectros de masas de los ésteres se realizan sobre fracciones puras.

c. Los niveles de trazas de estos pigmentos solo permitió asignar el ión molecular.

d. Se indica el resultado positivo o negativo del test. En el caso de la prueba de grupos hidroxilos se refleja el número de grupos funcionales encontrado.



Como puede observarse, tanto en los extractos de trigo duro como de tritordeum, el pico mayoritario ($R_t=9.84$ min, pico 2) se correspondió con un carotenoide con espectro de absorción UV-visible (**Figura 59**) con máximos a 428, 448, 476 nm, y una marcada estructura fina ($\%III/II=65$), datos que son consistente con la presencia en el cromóforo de al menos 9 dobles enlaces conjugados en la cadena poliénica central, y previsiblemente un anillo ϵ - y otro β - en los extremos de la molécula (Britton, 1995). Cuando este pigmento fue aislado mediante cromatografía de capa fina (TLC), en las condiciones descritas en la sección de *Materiales y Métodos*, mostró un factor de retención (R_f) de 0.41, lo que le sitúa en la zona de elución de las xantofilas dihidroxiladas. Así mismo, los resultados de las pruebas químicas de presencia de grupos epóxidos y carbonilos fueron negativas. Dichas pruebas se realizaron sobre el extracto directo y sobre los pigmentos aislados, siendo controlado el resultado de las mismas mediante HPLC. Por el contrario, el resultado de la prueba de grupo hidroxilo (acetilación) realizado exclusivamente sobre el pigmento aislado fue positivo, sugiriendo la presencia de dos grupos hidroxilos al obtenerse los derivados monoacetilado y diacetilado del pigmento (**Figura 60**).

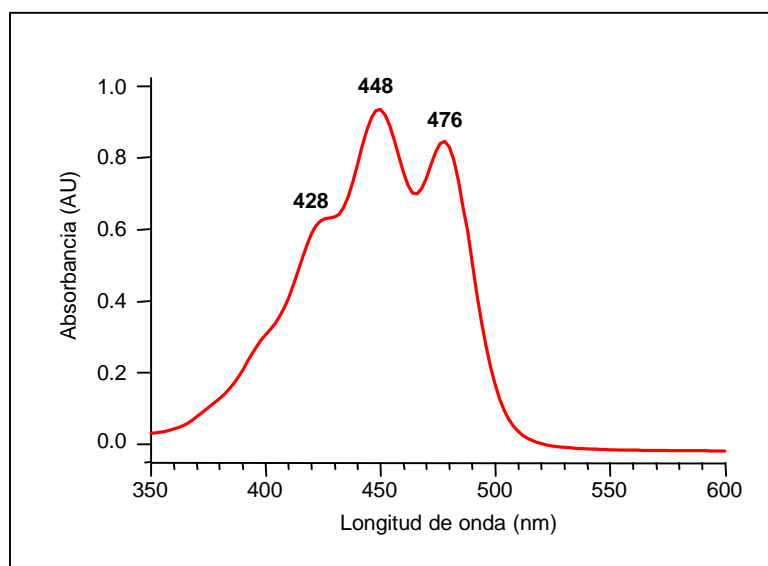


Figura 59. Espectro de absorción UV-visible de all-*trans*-luteína (pico 2) en el eluyente cromatográfico.

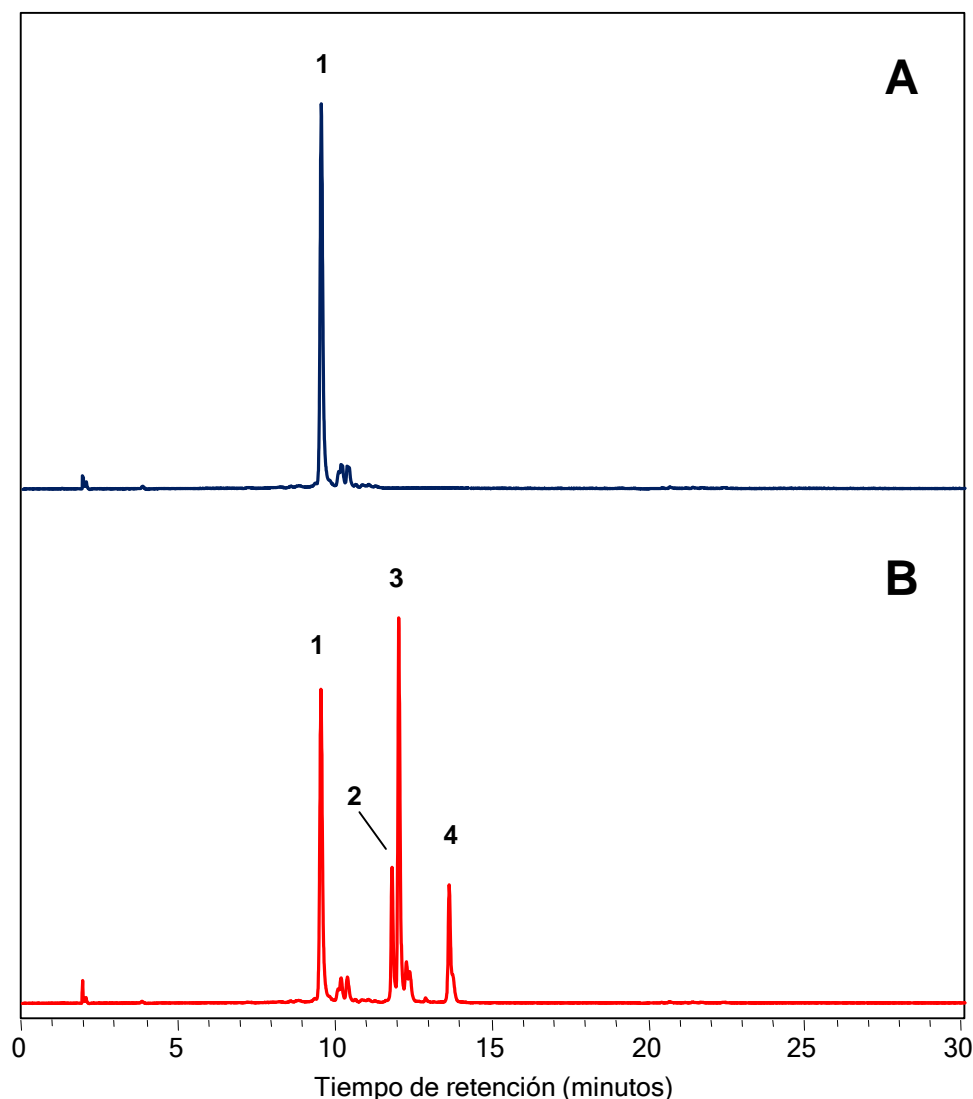


Figura 60. Ensayo de acetilación de luteína. Los cromatogramas A y B se corresponden con la muestra antes y después del ensayo, respectivamente. Identidad de los picos: **1.** *all-trans*-luteína; **2.** *all-trans*-luteína 3'-monoacetato; **3.** *all-trans*-luteína 3-monoacetato; **4.** *all-trans*-luteína 3,3'-diacetato. Detección a 450 nm.

El espectro de masas obtenido mediante la técnica acoplada HPLC-DAD-MS (APCI-MS, modo positivo) mostró un ión molecular a m/z 569.6 $[M+H]^+$ de baja intensidad (5%), y un fragmento muy abundante (100%) a m/z 551.7 correspondiente a la pérdida de una molécula de agua $[M+H-H_2O]^+$, así como otro fragmento de muy baja intensidad (2%) a m/z 533.7 correspondiente con una segunda pérdida de agua $[M+H-2H_2O]^+$. Estas características espectrales fueron congruentes con la presencia de dos hidroxilos en posición 3 y 3', así como con la presencia de un anillo terminal de tipo ϵ -, en el cual el hidroxilo se encuentra en posición alílica respecto al doble enlace, y cuya rotura en MS produce un catión, a m/z 551.7, bastante más estable que el producido de forma análoga a

partir de un anillo β - (Britton, 1995). La identidad de este compuesto como all-*trans*-luteína (3,3'-diol- β,ϵ -caroteno) fue finalmente confirmada por co-cromatografía con el correspondiente patrón de luteína. En la **Figura 61** se muestra el espectro de masas (APCI-MS (+)), así como el patrón de fragmentación. Como se discutirá y desarrollará más adelante, el patrón de fragmentación característico de luteína permite una fácil distinción de éste pigmento frente a otros análogos, como es el caso de zeaxanteno.

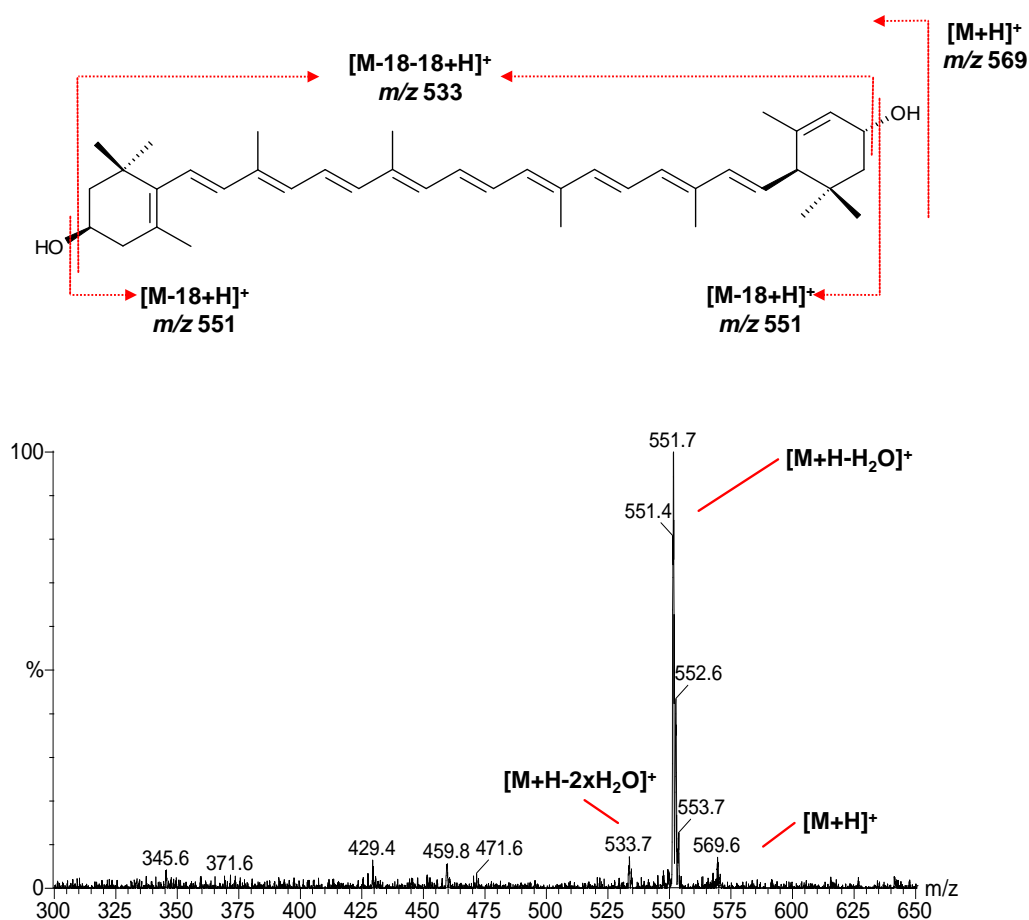


Figura 61. Espectro de masas (APCI-MS (+)) y patrón de fragmentación de all-*trans*-luteína (3,3'-diol- β,ϵ -caroteno) (pico 2, Rt=9.84 minutos).

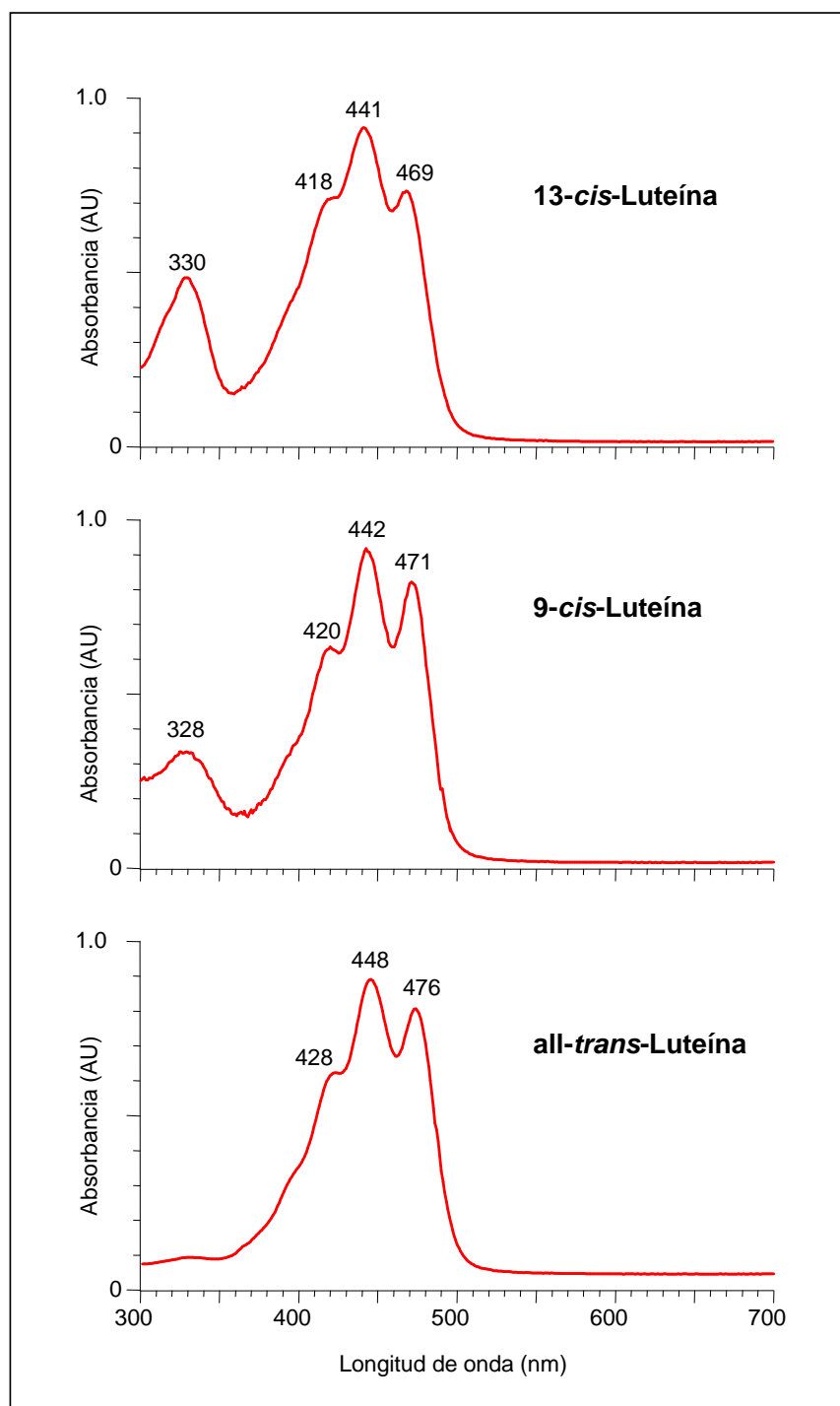


Figura 62. Espectros de absorción UV-visible de all-*trans*-luteína, 9-*cis*-luteína y 13-*cis*-luteína (picos 2, 3 y 4, respectivamente).

Los picos que eluyen inmediatamente después de all-*trans*-luteína, a tiempos de retención 10.53 y 10.75 min, picos 3 y 4 respectivamente, presentaron las mismas propiedades que all-*trans*-luteína, salvo la presencia en el espectro de absorción UV-visible de un máximo de absorción (A_B) en torno a 330 nm, lo cual es característico de los

isómeros *cis*- de carotenoides (Britton, 1995, Khachik, Beecher, y Whittaker, 1986). Estos isómeros se caracterizan por presentar un desplazamiento hipsocrómico de unos 4-8 nm en los máximos de absorción respecto a la forma *all-trans* (Tabla 10), y una intensidad del máximo A_B ($\%A_B/II$) tanto mayor cuanto más simétrica es la posición del enlace *cis* en la molécula. Además, los isómeros *cis* eluyen en cromatografía reversa en columna C18 a tiempos de retención ligeramente superiores a la forma *all-trans*. En el caso de luteína, la asimetría de la molécula determina la posibilidad de 2 estereo-isómeros *cis* para cada posición de la cadena polienoica central, por ejemplo 9 y 9'-*cis*, los cuales no se separan ni diferencian en las condiciones cromatográficas empleadas. Teniendo en cuenta todo esto, los picos 3 y 4 fueron identificados como 9-*cis*-luteína (ó 9'-*cis*-luteína) y 13-*cis*-luteína (ó 13'-*cis*-luteína), respectivamente. En la Figura 62 se muestran los espectros de absorción UV-visible de *all-trans*-luteína, 9-*cis*-luteína y 13-*cis*-luteína.

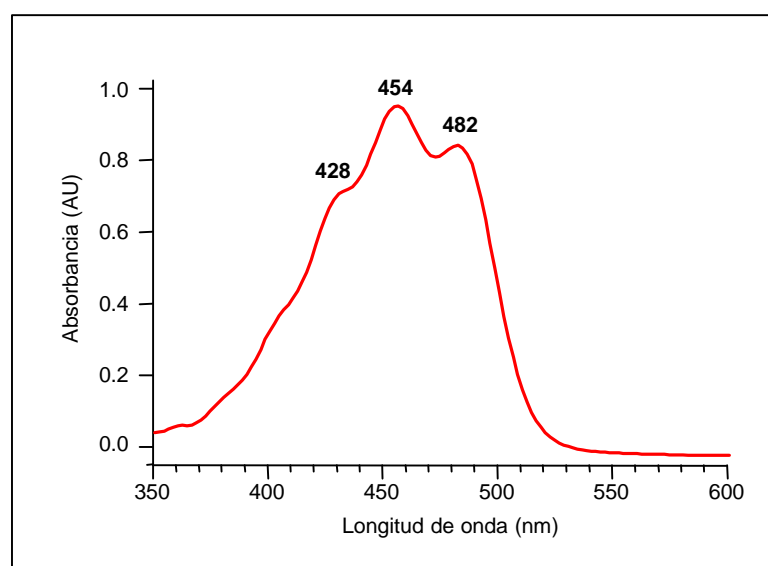


Figura 63. Espectro de absorción UV-visible de *all-trans*-zeaxanteno (pico 1) en el eluyente cromatográfico.

En el caso de las muestras de trigo duro, el pico 1 ($R_t=9.62$ min, Figura 57) mostró un espectro de absorción UV-visible con máximos a (428), 454, 482 nm (Figura 63) y una estructura fina reducida ($\%III/II=8$), lo cual sugirió la presencia de 9 dobles enlaces conjugados en la cadena polienoica central del cromóforo, y anillos de tipo β - en los extremos (Britton, 1995). Cuando este pigmento fue aislado mediante TLC (en las condiciones descritas en la sección de *Materiales y Métodos*) mostró una movilidad relativa ($R_f=0.40$) acorde con la naturaleza de xantofila dihidroxilada. Al igual que lo descrito para



luteína, las pruebas de presencia de grupos epóxidos y carbonilos fueron negativas. El espectro de masas (APCI-MS, modo positivo) mostró un ión molecular a m/z 569.6 $[M+H]^+$ con una abundancia elevada (100%), y un fragmento poco abundante (12%) a m/z 551.7 correspondiente a la pérdida de una molécula de agua $[M+H-H_2O]^+$, y otro fragmento de menor intensidad (2%) a m/z 533.7 correspondiente con una segunda pérdida de agua $[M+H-2H_2O]^+$. De dichas características espectrales se dedujo la presencia de dos hidroxilos en las posiciones 3 y 3' de los anillos terminales de tipo β . La presencia de dos hidroxilos fue confirmada mediante acetilación y control de la reacción por HPLC, observándose la presencia del derivado monoacetilado y diacetilado (**Figura 64**).

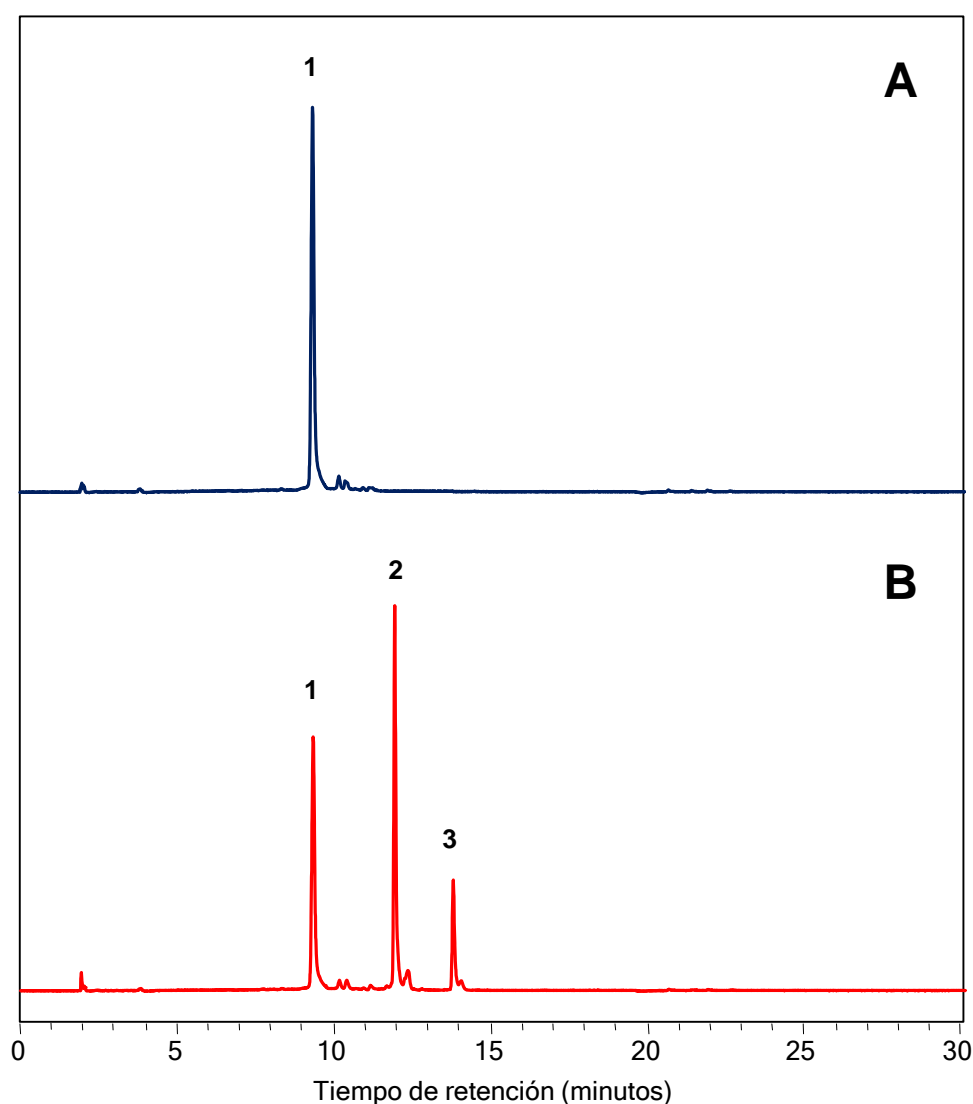


Figura 64. Ensayo de acetilación zeaxanteno. Los cromatogramas A y B se corresponden con la muestra antes y después del ensayo, respectivamente. Identidad de los picos: **1.** *all-trans*-zeaxanteno; **2.** *all-trans*-zeaxanteno 3-monoacetato; **3.** *all-trans*-zeaxanteno 3,3'-diacetato. Detección a 450 nm.

Por todo ello, este compuesto se identifica como all-*trans*-zeaxanteno (3,3'-diol- β,β -caroteno), identidad que fue confirmada por co-cromatografía con el correspondiente patrón. En la **Figura 65** se muestran el espectro de masas (APCI-MS (+)), así como el patrón de fragmentación de zeaxanteno. Cabe destacar la ausencia de este pigmento en tritordeum, lo cual contrasta con la presencia en los trigos duros, parentales de los primeros. Este hecho será comentado posteriormente a nivel biosintético.

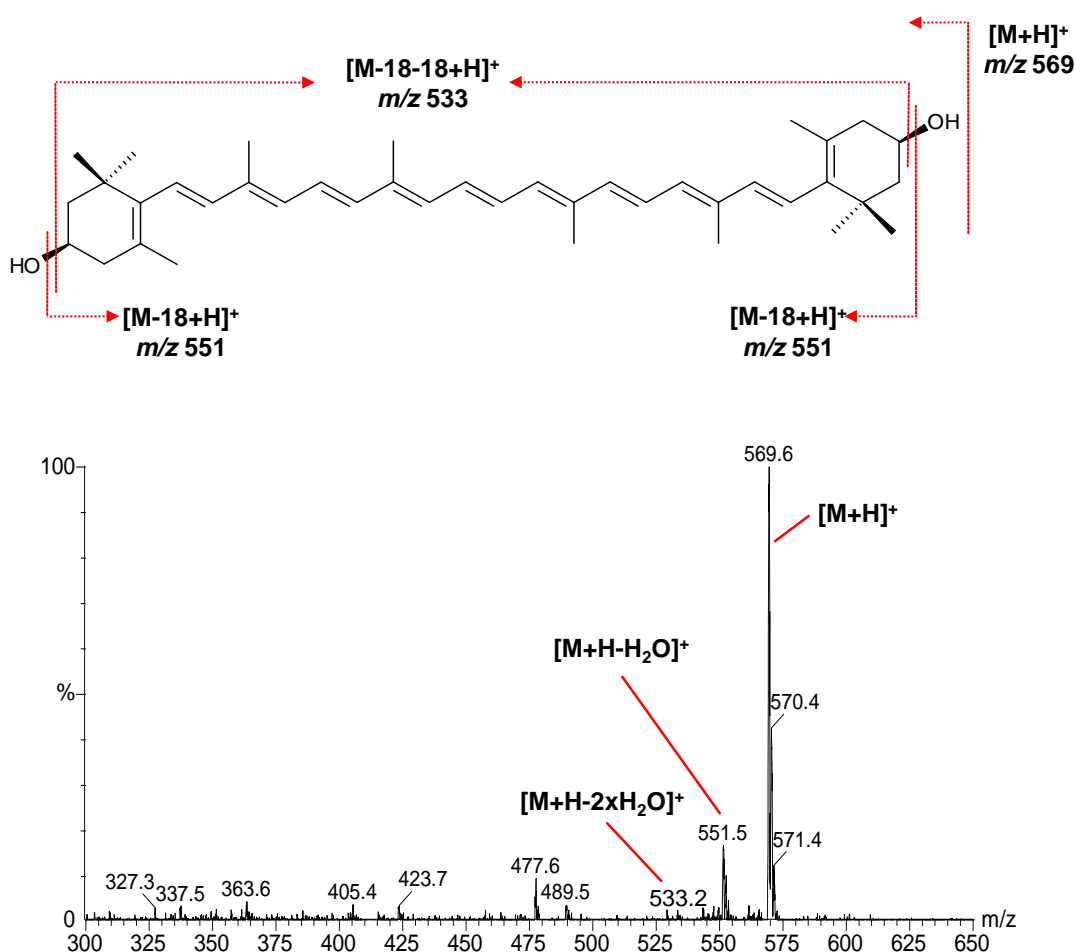


Figura 65. Espectro de masas (APCI-MS (+)) y patrón de fragmentación de all-*trans*- zeaxanteno (3,3'-diol- β,β -caroteno) (pico 1, R_t =9.62 minutos) aislado de granos de trigo duro.

Finalmente, en las muestras de trigo duro se identificaron all-*trans*- α -caroteno (all-*trans*- β,ϵ -caroteno) y all-*trans*- β -caroteno (all-*trans*- β,β -caroteno) a tiempos de retención 16.85 y 17.05 minutos, respectivamente. Desafortunadamente, los bajos niveles de concentración de estos pigmentos no permitieron el aislamiento de los mismos en cantidad

suficiente para realizar pruebas de identificación específicas. Debido a ello, su identificación se basó exclusivamente en las propiedades cromatográficas y espectroscópicas (UV-visible y MS; **Figuras 66 y 67**) obtenidas mediante el análisis de las muestras por HPLC, así como su comparación y co-cromatografía con patrones obtenidos en nuestro laboratorio a partir de fuentes ricas en estos pigmentos como la zanahoria (*Daucus carota* L.) (Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez, 1993). El espectro de masas obtenido mediante HPLC-DAD-MS (APCI-MS, modo positivo) mostró en ambos casos un ión molecular a m/z 537 $[M+H]^+$ congruente con la fórmula $C_{40}H_{56}$, característica de los dos carotenos. El espectro de UV-visible de all-*trans*- β -caroteno exhibió máximos de absorción a 428, 452, 480 nm y una estructura fina reducida (%III/II=10), lo cual se corresponde con un cromóforo conformado por nueve enlaces dobles conjugados y dos anillos de tipo β -. En el caso de all-*trans*- α -caroteno, el espectro de UV-visible presentó máximos de absorción a 424, 448, 474 nm y una destacada estructura fina (%III/II=55), sugiriendo un cromóforo compuesto de nueve enlaces dobles conjugados, así como un anillo de tipo β - y otro de tipo ε -.

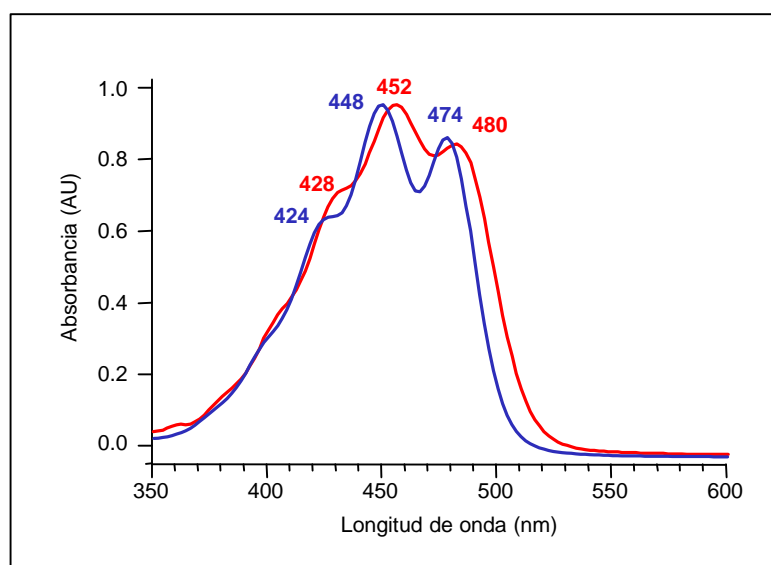


Figura 66. Espectros de absorción UV-visible de all-*trans*- α -caroteno (—; pico 7, R_t =16.85 minutos) y all-*trans*- β -caroteno (—; pico 8, R_t =17.05 minutos) en el eluyente cromatográfico.

Cabe señalar, que mientras en trigo duro se observó la presencia de ambos pigmentos, en el caso de tritordeum β -caroteno se encontró en concentraciones a nivel de trazas y difícilmente cuantificable, y α -caroteno no fue detectado. En la **Tabla 10** se recogen las características cromatográficas y espectroscópicas de ambos carotenos. A modo de resumen, en la **Figura 68** se muestran las estructuras químicas de los pigmentos

carotenoides identificados en las variedades de trigo duro y líneas de tritordeum objeto de estudio en el presente trabajo de investigación.

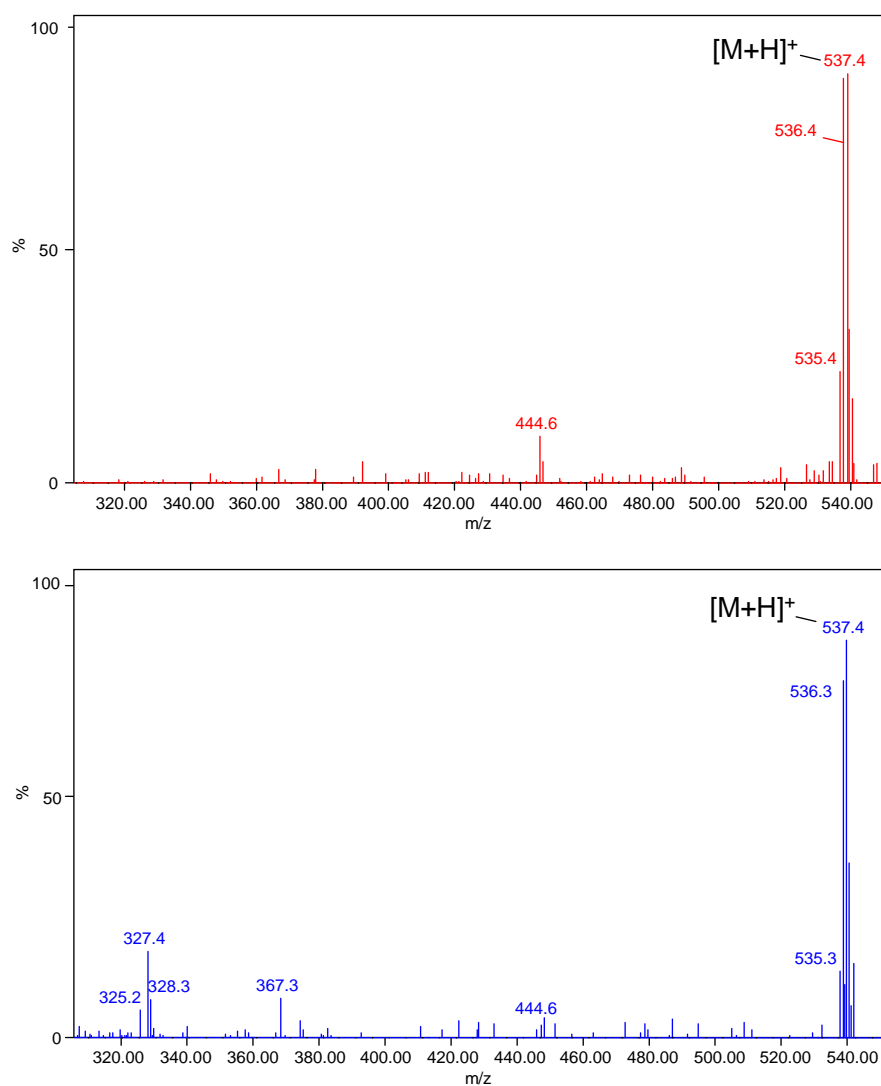
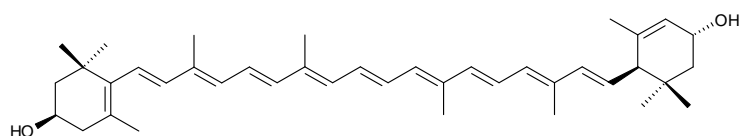
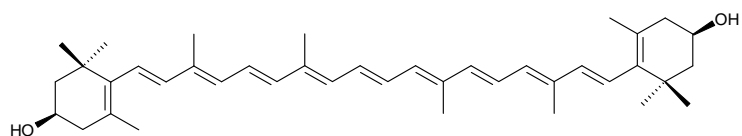


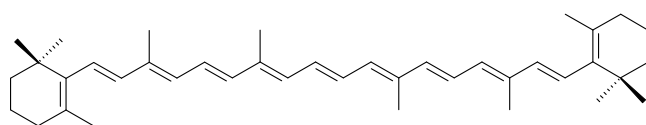
Figura 67. Espectros de masas de all-*trans*-α-caroteno (—; pico 7, Rt=16.85 minutos) y all-*trans*-β-caroteno (—; pico 8, Rt=17.05 minutos) obtenidos mediante la técnica HPLC-MS (APCI-MS (+)).



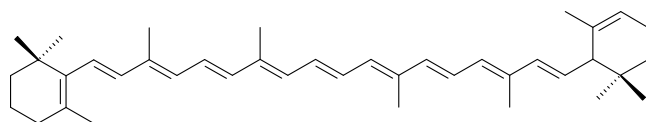
all-trans-Luteína (3,3'-diol-β,ε-caroteno)



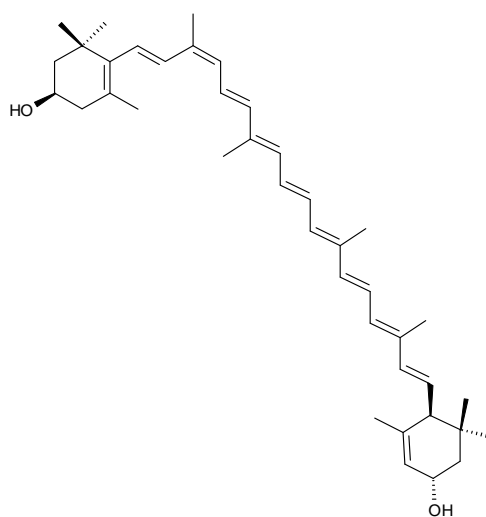
all-trans-Zeaxanteno (3,3'-diol-β,β-caroteno)



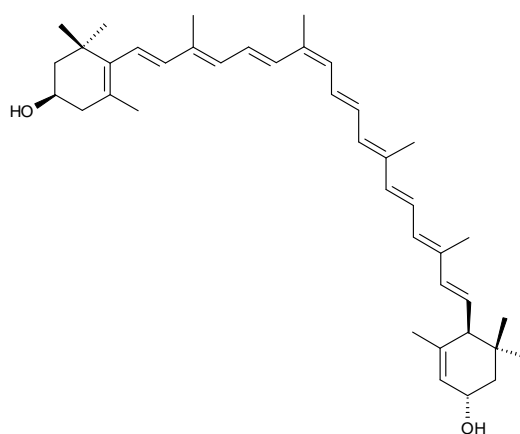
all-trans-β-Caroteno (β,β-caroteno)



all-trans-α-Caroteno (β,ε-caroteno)



9-*cis*-β-Luteína (9-*cis*-3,3'-diol-β,ε-caroteno)



3-*cis*-β-Luteína (13-*cis*-3,3'-diol-β,ε-caroteno)

Figura 68. Estructura de los carotenos y xantofilas libres presentes en granos de tritordeum y trigo duro.



5.1.2. Aislamiento e identificación de regioisómeros de ésteres de luteína en tritordeum.

La presencia en la molécula de luteína de dos anillos de ionona terminales diferentes, β - y ϵ - respectivamente, hace que los correspondientes hidroxilos presentes en las posiciones 3 y 3' no sean equivalentes (ver **Figura 68**). Esta propiedad es responsable de la presencia de derivados acilados (es decir, esterificados con grupos acilo), como los ésteres de luteína con ácidos grasos, que puedan ser diferenciados en función de la posición del grupo acilo (3 o 3'), siendo llamados *Regioisómeros*. De esta forma tendremos dos regioisómeros para cada forma monoesterificada de luteína, como por ejemplo luteína-3-*O*-miristato y luteína-3'-*O*-miristato en el caso de los ésteres de luteína con ácido mirístico (C14:0). De igual modo tendremos dos regioisómeros para las formas diesterificadas mixtas (heterodiésteres), es decir aquellas en las que participan dos grupos acilo diferentes, como por ejemplo luteína-3-*O*-miristato-3'-*O*-estearato y luteína-3-*O*-estearato-3'-*O*-miristato. Como es lógico, para las formas diesterificadas con el mismo ácido graso (homoésteres) no tendremos la posibilidad de formación de regioisómeros. En el presente apartado se aborda por primera vez la caracterización de los regioisómeros de ésteres de luteína presentes en cereales, concretamente en tritordeum.

Hasta hace relativamente poco tiempo, los regioisómeros de luteína y otras xantofilas no habían sido observados, e incluso ignorados (Gau *et al.*, 1983; Tian *et al.*, 2003), existiendo poca información sobre los mismos (Subagio y Morita, 1997; Schweiggert *et al.*, 2005). Probablemente, la principal razón de este hecho ha sido la insuficiente o nula resolución de éstos compuestos mediante el uso de columnas de fase reversa C18 para el análisis rutinario de carotenoides mediante HPLC, aunque existen algunos trabajo pioneros (Khachik *et al.*, 1988) que han descrito la separación de monoésteres de luteína en tales condiciones. Cabe en este punto anticipar que el presente trabajo también consigue la resolución cromatográfica de los regioisómeros de luteína a nivel de monoésteres. La introducción de columnas C30 de fase reversa, con mayor poder de resolución para carotenos y xantofilas esterificadas, ha permitido finalmente la separación y cuantificación regioisómeros de xantofilas en diversas matrices (Breithaupt *et al.*, 2002; Young *et al.*, 2007).

La espectrometría de masas se ha convertido en los últimos años en una herramienta rutinaria, y cada vez más asequible para la mayoría de los investigadores, para la correcta identificación de los pigmentos carotenoides. La técnica de ionización mayoritariamente utilizada en el estudio de los carotenoides hasta la fecha es la APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*), cuyo uso ha sido extensamente revisado por van Breemen *et al.* (1996), Pajkovic y van Breemen (2005) y Rezanka *et al.* (2009). Los



espectros de masas producidos mediante APCI(+) se caracterizan por la presencia mayoritaria de iones del tipo $[M]^+$ y $[M+H]^+$, así como $[M+H-18]^+$ en el caso de las xantofilas hidroxiladas por pérdida de una molécula de agua (van Breemen *et al.*, 1996; Clarke *et al.*, 1996; Glaser *et al.*, 2003). Como ya se ha apuntado en el apartado anterior, luteína presenta un patrón de fragmentación de masas característico cuando se utilizan APCI como técnica de ionización en espectrometría de masas, lo cual permite una clara diferenciación de zeaxanteno, su homólogo estructural más cercano (ver estructuras en la **Figura 68**) (Maoka *et al.*, 2002; Atienza *et al.*, 2007b; Rezanka *et al.*, 2009). Ambos pigmentos tienen la misma fórmula química, $C_{40}H_{56}O_2$ (Mw=568.42), diferenciándose exclusivamente en la posición de doble enlace en un anillo terminal, y presentando en ambos casos dos hidroxilos en las posiciones 3 y 3'. En términos teóricos, ambos pigmentos deben tener un patrón de fragmentación de masas con pérdidas sucesivas de uno y dos hidroxilos en forma de agua ($[M+H-H_2O]^+$ $m/z=551.42$ y $[M+H-2H_2O]^+$ $m/z=533.41$, respectivamente). Sin embargo en este punto reside la gran diferencia entre ambos pigmentos. En el caso de zeaxanteno los fragmentos correspondientes a la pérdida de una y dos moléculas presentan abundancias bajas (menores del 10%) usando la técnica de APCI, tal y como se mostró en la **Figura 65**, mientras que en luteína se observa un ión muy abundante (generalmente el de mayor abundancia; ver **Figura 61**) correspondiente a la pérdida del grupo hidroxilo en posición 3' ($[M+H-H_2O]^+$ $m/z=551.42$). Esta diferencia se debe a la mayor estabilidad del catión formado por fragmentación y pérdida de una molécula de agua en la posición 3' a partir del ión molecular $[M+H]^+$, frente al catión que se forma en la posición 3, debido a la presencia en el primero de los casos de un doble enlace en posición alílica (conjugada), tal y como se muestra en la **Figura 69**.

Como se mostrará más adelante, la utilidad de este mecanismo, va más allá de la diferenciación entre zeaxanteno y luteína, de tal forma que posibilita conocer qué posición, 3 o 3', se encuentra esterificada en un monoéster de luteína, permitiendo establecer la naturaleza del *Regioisómero* correspondiente, ayudando entre otras cosas a inferir aspectos, hasta ahora desconocidos, en relación a los mecanismos biosintéticos implicados en esterificación de las xantofilas.

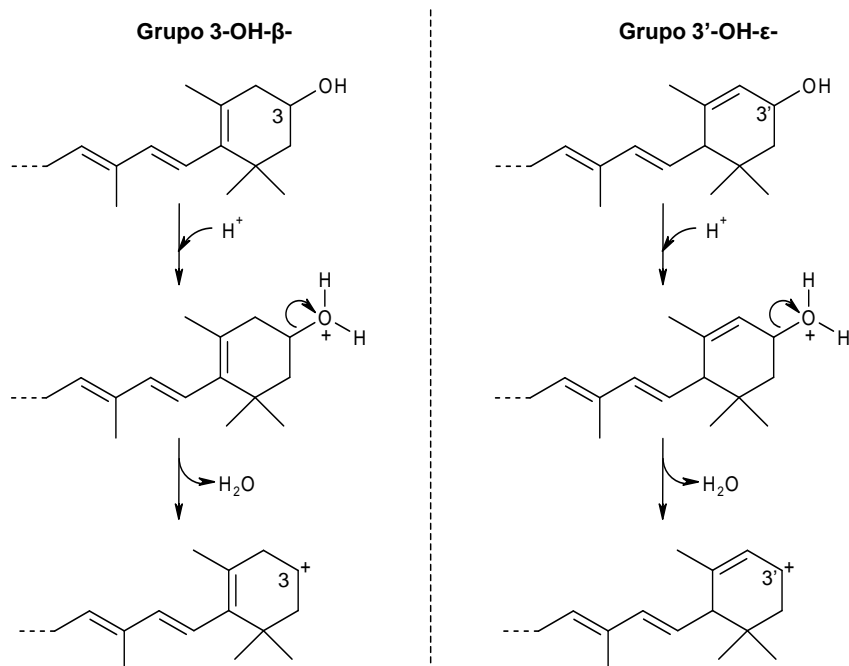


Figura 69. Formación de cationes en las posiciones 3 y 3', tras la pérdida neutra de una molécula de agua durante la protonación y fragmentación en condiciones APCI(+) a partir de un anillo 3-OH-β- y 3'-OH-ε-, respectivamente.

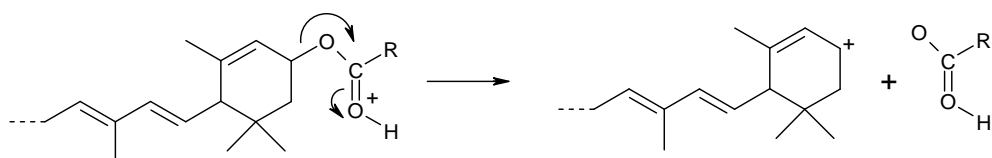


Figura 70. Mecanismo de fragmentación en condiciones ionización química a presión atmosférica (APCI) y pérdida neutra de un grupo acilo esterificando a luteína en la posición 3'.

De este modo, si se trata de un monoéster luteína-3'-*O*-acilo, el ión más abundante será el correspondiente a la pérdida neutra del grupo acilo, tal y como se muestra en la **Figura 70**, presentando un valor m/z de 551 $[M+H-\text{acilo}]^+$. Por el contrario si se trata de un monoéster del tipo luteína-3-*O*-acilo, el ión más abundante será el correspondiente a la pérdida de una molécula de agua ($[M+H-H_2O]^+$), cuyo valor m/z dependerá del grupo acilo que esté esterificando. En ambos casos se observará el ión con valor m/z 533 correspondiente a la subsiguiente pérdida de agua o grupo acilo según el caso, pero que será minoritario en términos de abundancia. De forma análoga, en el caso de ésteres



mixtos se podrán distinguir los regioisómeros, ya que el ión más abundante se corresponderá con aquél formado tras la escisión del grupo acilo en posición 3'. Esta poderosa herramienta, ha sido ya parcialmente utilizada en algunos estudios recientes realizados con mezclas de ésteres de luteína obtenidos a partir de extractos de pétalos de marigold (*Tagetes erecta* L.) (Breithaupt *et al.*, 2002) y de suplementos comerciales de luteína (Young *et al.*, 2007), en los cuales se ha demostrado la gran utilidad de la espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida como herramienta para el estudio de los regioisómeros de luteína esterificada.

A modo de generalización, en las **Figuras 71 a 75** se muestran los patrones de fragmentación y los correspondientes espectros de masas teóricos que deberemos obtener mediante APCI(+) para los distintas posibilidades de regioisómeros de ésteres de luteína esterificada con ácidos grasos. Por aciloB y aciloE se denotan a los grupos acilo en las posiciones 3 del anillo β - y 3' de anillo ϵ -, respectivamente. Se presentan los dos monoésteres posibles, luteína-3-*O*-aciloB y luteína-3'-*O*-aciloE, mientras que en el caso de los diésteres se muestran los dos posibles regioisómeros (luteína-3'-*O*-acilo1E-3-*O*-acilo2B y luteína-3'-*O*-acilo2E-3-*O*-acilo1B) distinguiendo entre el acilo1 y el acilo2, que necesariamente deben ser distintos (se ha supuesto en todo momento que el acilo1 tiene mayor peso molecular que el acilo2). Se incluye también el espectro para un homodíéster de luteína (**Figura 75**), en el cual las identidades de acilo1 y acilo2 son coincidentes. Para facilitar la correspondencia entre el espectro de masas y el patrón de fragmentación el color de las líneas de fragmentación se corresponde con el color de la línea para ión correspondiente.

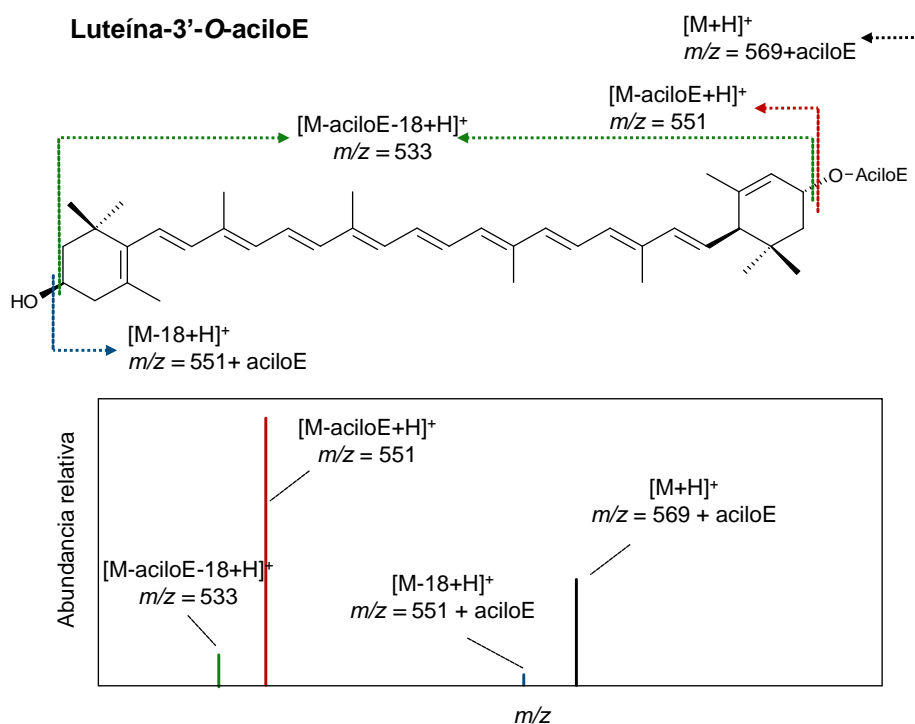


Figura 71. Patrón de fragmentación y espectro de masas (APCI-MS (+)) del regioisómero luteína-3'-O-acilo. AciloE: grupo acilo en posición 3' del anillo ϵ -.

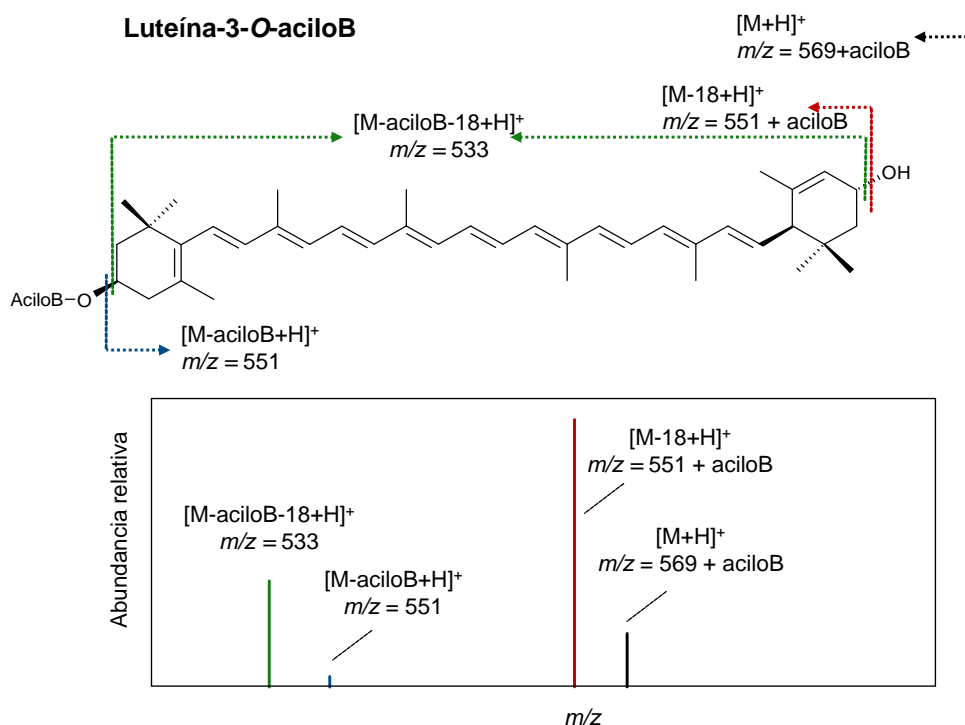


Figura 72. Patrón de fragmentación y espectro de masas (APCI-MS (+)) del regioisómero luteína-3-O-acilo. AciloB: grupo acilo en posición 3 del anillo β -.

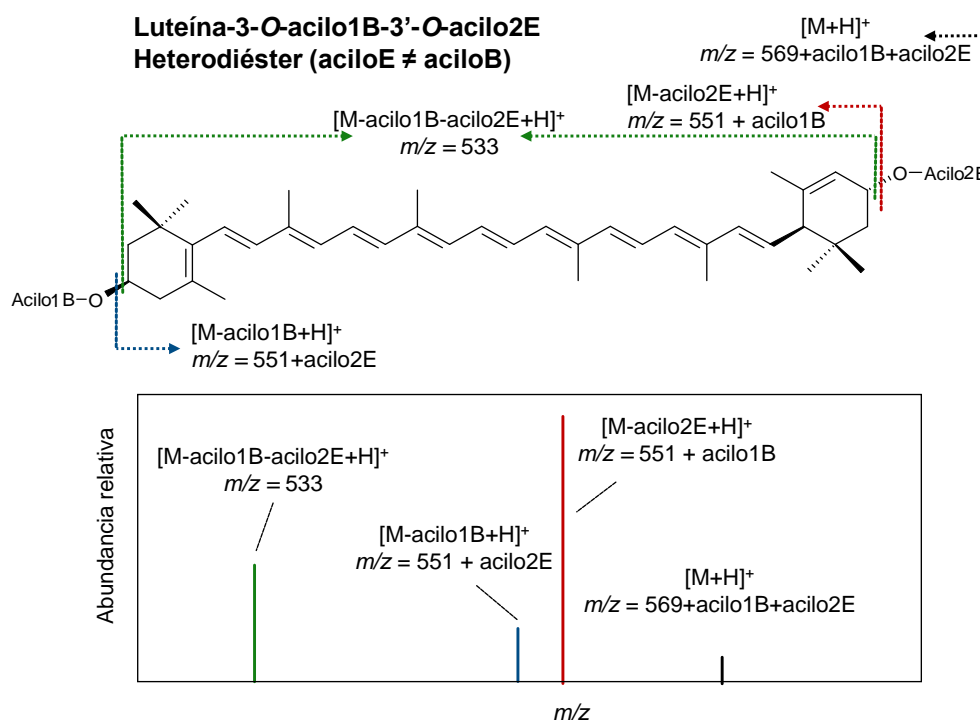


Figura 73. Patrón de fragmentación y espectro de masas (APCI-MS (+)) del regioisómero luteína-3-O-acilo1B-3'-O-acilo2E (Heterodíéster; acilo1≠acilo2). AciloB: grupo acilo en posición 3 del anillo β-; AciloE: grupo acilo en posición 3' del anillo ε-.

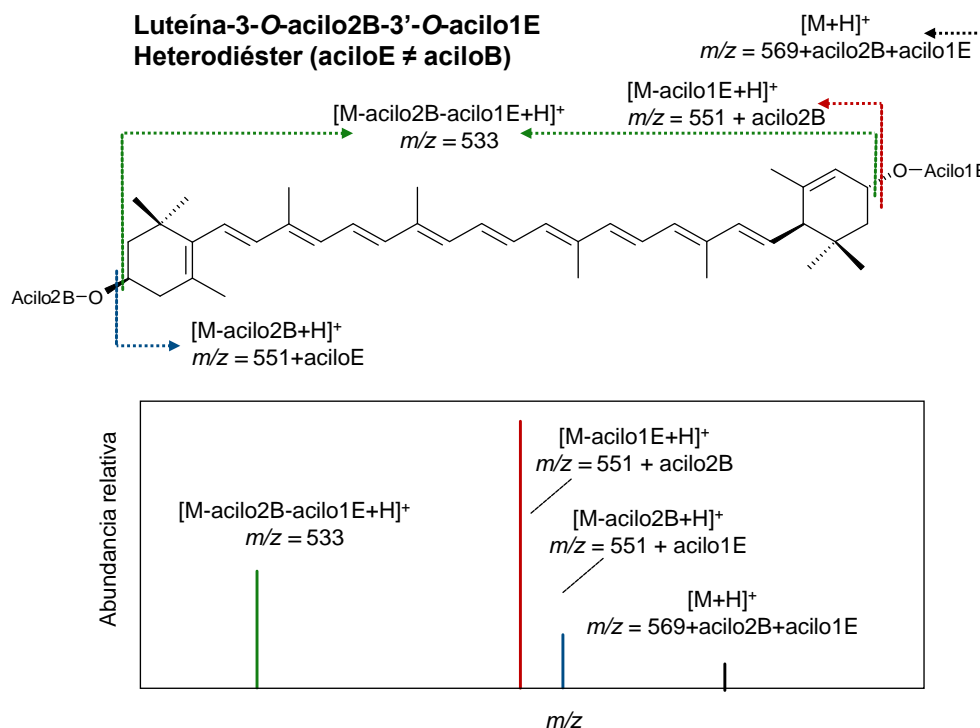


Figura 74. Patrón de fragmentación y espectro de masas (APCI-MS (+)) del regioisómero luteína-3-O-acilo2B-3'-O-acilo1E (Heterodíéster; acilo1≠acilo2). AciloB: grupo acilo en posición 3 del anillo β-; AciloE: grupo acilo en posición 3' del anillo ε-.

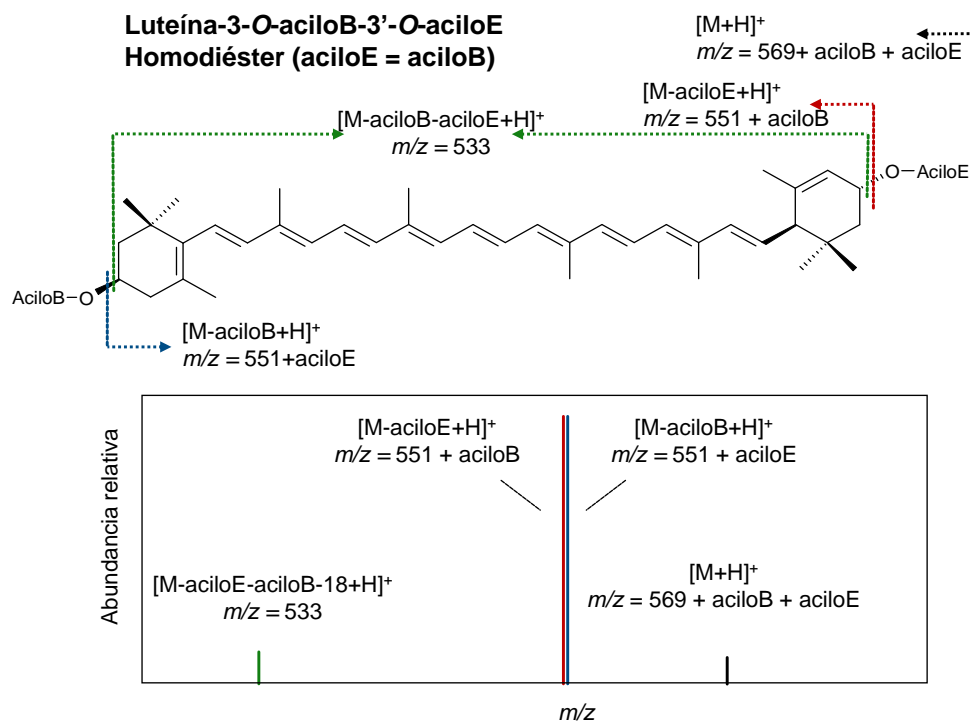


Figura 75. Patrón de fragmentación y espectro de masas (APCI-MS (+)) del homodíéster de luteína (luteína-3-O-aciloB-3'-O-aciloE (Homodíéster; aciloB=aciloE). AciloB: grupo acilo en posición 3 del anillo β -; AciloE: grupo acilo en posición 3' del anillo ϵ -.

Teniendo en cuenta estos aspectos, en el presente estudio, se ha abordado la identificación de la naturaleza de la esterificación de los distintos ésteres de luteína presentes en líneas avanzadas de tritordeum, así como la determinación de los correspondientes regioisómeros de monoésteres y diésteres, resultados que han sido recientemente publicados (Mellado-Ortega y Hornero-Méndez, 2012). Para ello, tras obtener un extracto directo concentrado de xantofilas de tritordeum (línea HT621), se procedió al aislamiento mediante HPLC de las dos fracciones de luteína monoesterificada (denominadas anteriormente como luteína monoéster 1 y luteína monoéster 2; **Tabla 10**), y de las tres fracciones de luteína diesterificada (denominadas como luteína diéster 1, luteína diéster 2, y luteína diéster 3; **Tabla 10**). Todo el extracto disponible se cromatografió y fraccionó en las mismas condiciones cromatográficas de HPLC empleadas para el análisis cuantitativo (fase reversa C18), descartando la fracción correspondiente a luteína libre, y recogiendo mediante colector de fracciones (en línea con el detector DAD) las cinco fracciones mencionadas, para lo cual se realizaron unas 50 inyecciones de 100 μ L. Cada



una de las fracciones de esterificación fue concentrada a sequedad y disuelta en 500 μL de acetona, analizándose seguidamente mediante LC-DAD-MS (APCI(+)), para lo cual se empleó una columna analítica YMC C30 (fase reversa), la cual presenta un mayor poder de resolución para las xantofilas esterificadas, y por lo tanto es más idónea que las clásicas columnas C18 para la caracterización mediante espectrometría de masas en línea. En la **Figura 76** se muestran los cromatogramas correspondientes a las 5 fracciones de luteína esterificada aisladas, una vez separadas en fase reversa C30 (ver sección de *Materiales y Métodos*).

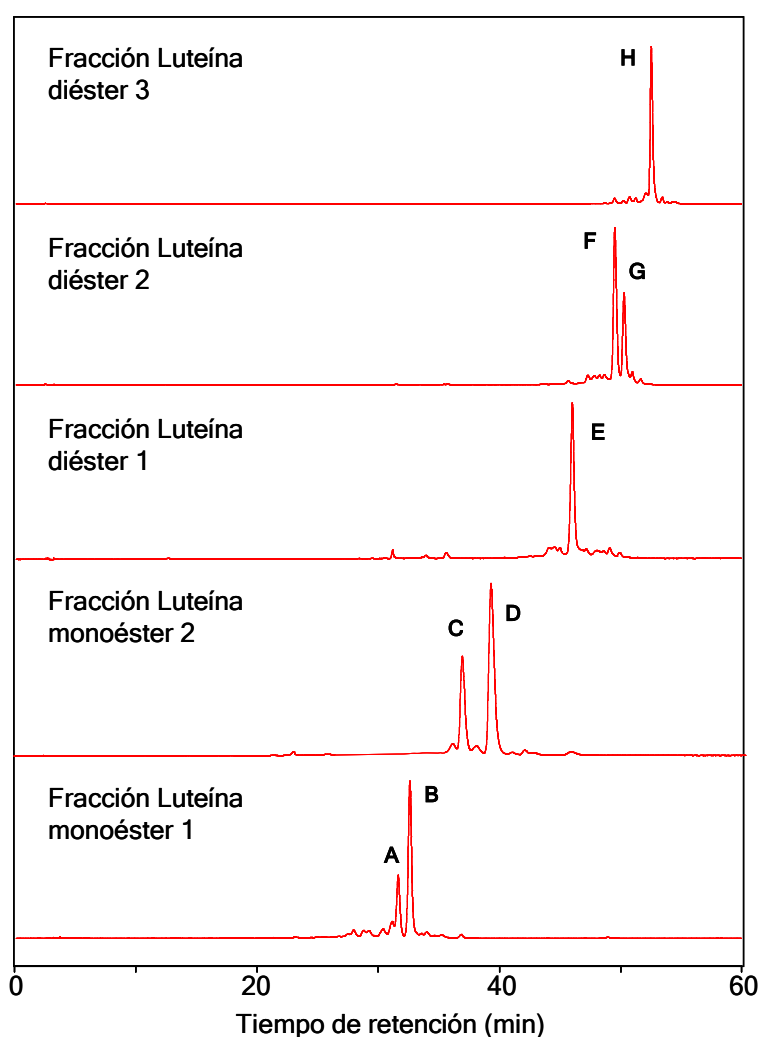


Figura 76. Fracciones de monoésteres y diésteres aisladas de un extracto concentrado de tritordeum mediante cromatografía reversa C18, y cromatografiadas mediante fase reversa C30. Detección UV-visible a 450 nm.



Como puede comprobarse, en el caso de las fracciones correspondientes a monoésteres de luteína (luteína monoéster 1 y luteína monoéster 2), lo que en fase reversa C18 se insinuaba como un conjunto de picos parcialmente resueltos, se resolvió perfectamente cuando se cromatografió en fase reversa C30, estando compuesta cada fracción por dos picos mayoritarios y bien resueltos. En el caso de las fracciones de diésteres (luteína diéster 1, luteína diéster 2, y luteína diéster 3), se observó como la primera y tercera fracción se correspondieron con un solo pico, mientras que en la fracción intermedia se separaron dos picos cromatográficos. *A priori* debemos pensar que tanto en las fracciones de monoésteres como de diésteres que dan lugar a dos picos se debe a la presencia de regioisómeros, extremo que debemos demostrar. La identidad de cada pico fue confirmada mediante espectrometría de masas (APCI(+)) haciendo uso de las características espectrales de luteína, anteriormente expuestas.

Cuando la **fracción luteína monoéster 1** se analizó mediante LC-MS (APCI) se observó como el pico que eluyó a menor tiempo de retención ($R_t=30.76$ min, pico A; **Figura 76**) mostró un espectro de masas en el que destaca el ión con m/z 551.77 (100%), y un ión molecular $[M+H]^+$ con m/z 831.30 (23%), lo cual indicó claramente que este compuesto se correspondía con el monoéster de luteína con ácido linoléico (C18:2, $M_w=280.24$) en la posición 3'-O, asignándose la identidad de éste pico con el regioisómero luteína-3'-O-linoleato. Cuando se analizó el espectro de masas del pico adyacente ($R_t=31.72$ min, pico B; **Figura 76**), y mayoritario, se observaron dos fragmentos principales, uno a m/z 813.99 (100%) que se corresponde con la pérdida de agua en la posición 3' ($[M+H-H_2O]^+$), y otro a m/z 533.42 correspondiente con la pérdida subsiguiente de una molécula de ácido linoléico ($[M+H-H_2O\text{-linoléico}]^+$). Por lo tanto en este caso la asignación estructural se corresponde con el regioisómero luteína-3-O-linoleato. La **Figura 77** muestra los correspondientes espectros de masas y la interpretación de las fragmentaciones de ambos compuestos.

De manera análoga cuando se analizó la **fracción luteína monoéster 2** se observó como el pico que eluyó primero ($R_t=36.09$ min, pico C; **Figura 76**) mostró un espectro de masas en el que destacaba un ión con m/z 551.77 (100%), y un ión molecular $[M+H]^+$ con m/z 808.21 (26%), lo cual indicaba que se trataba de un monoéster de luteína con ácido palmítico (C16:0, $M_w=256.24$) en la posición 3'-O, quedando asignada la identidad de éste compuesto como el regioisómero luteína-3'-O-palmitato. Cuando se analizó el espectro de masas del pico que eluyó a continuación, y como en el caso anterior también mayoritario, ($R_t=38.40$ min, pico D; **Figura 76**) se observaron dos iones principales, uno a m/z 790.04 (100%), correspondiente a la pérdida de agua en la posición 3'-O ($[M+H-H_2O]^+$), y otro a m/z 533.72 debido a la pérdida subsiguiente de una molécula de ácido palmítico ($[M+H-H_2O\text{-palmítico}]^+$). Por lo tanto en este caso la asignación estructural se determinó como el



regioisómero luteína-3-*O*-palmitato. La **Figura 78** muestra los correspondientes espectros de masas, así como la interpretación de las fragmentaciones para ambos monoésteres.

Como ya se mencionó anteriormente, al analizar la **fracción luteína diéster 1** se obtuvo como resultado un sólo pico cromatográfico ($R_t=45.88$ min, pico E; **Figura 76**), lo que sugiere que se trata de un homodíéster, es decir un diéster en el que los dos grupos acilos son idénticos, y por tanto no tendremos la posibilidad de regioisómeros. Cuando se analizó el espectro de masas (**Figura 79**) se observó un débil ión molecular a m/z 1093.89, un ión mayoritario a m/z 813.86 (100%) correspondiente a la pérdida de una molécula de ácido linoléico ($[M+H-\text{linoléico}]^+$), y otro a m/z 533.84 correspondiente con la pérdida subsiguiente de otra molécula de ácido linoléico ($[M+H-2 \text{ linoléico}]^+$). Por lo tanto en este caso la asignación estructural se corresponde con el diéster luteína-dilinoleato.

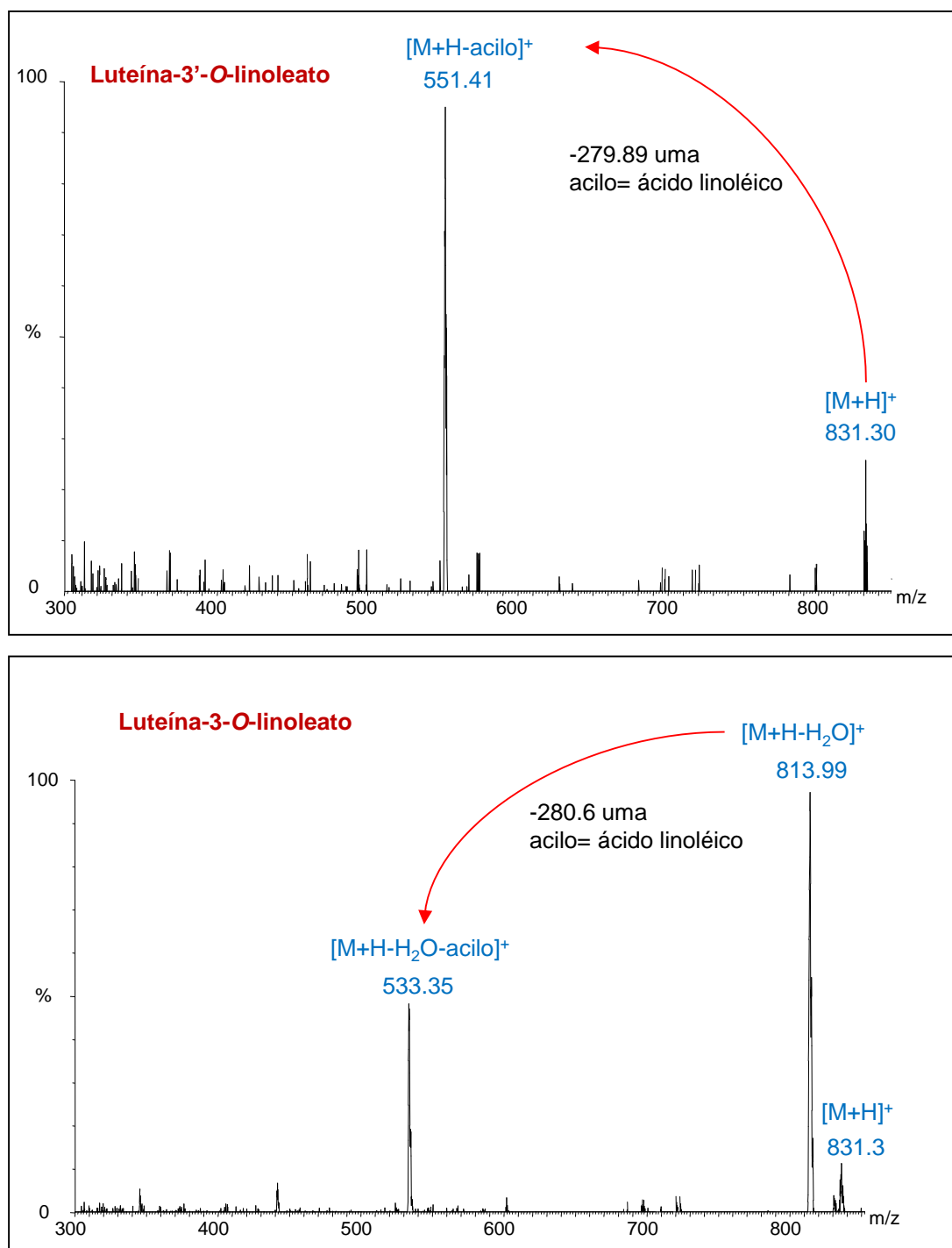


Figura 77. Espectros de masas (APCI, modo positivo) de los regioisómeros de luteína monoéster correspondientes a la fracción luteína monoéster 1. El pico a 30.76 minutos se asigna estructuralmente como luteína-3'-O-linoleato, y el pico a 31.72 minutos como luteína-3-O-linoleato.

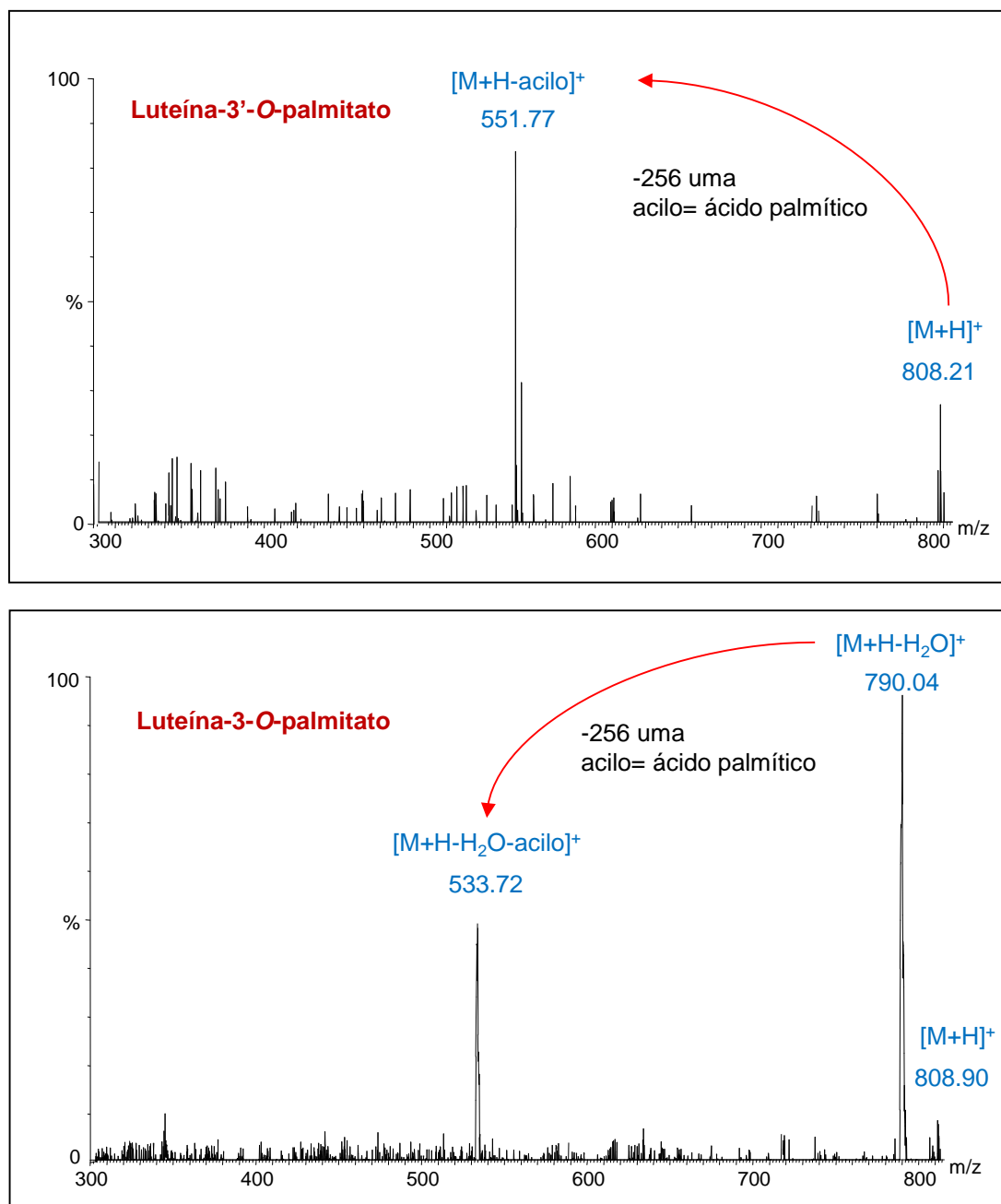


Figura 78. Espectros de masas (APCI, modo positivo) de los regioisómeros de luteína monoéster correspondientes a la fracción luteína monoéster 2. El pico a 36.09 minutos se asigna estructuralmente como luteína-3'-O-palmitato, y el pico a 38.40 minutos como luteína-3-O-palmitato.

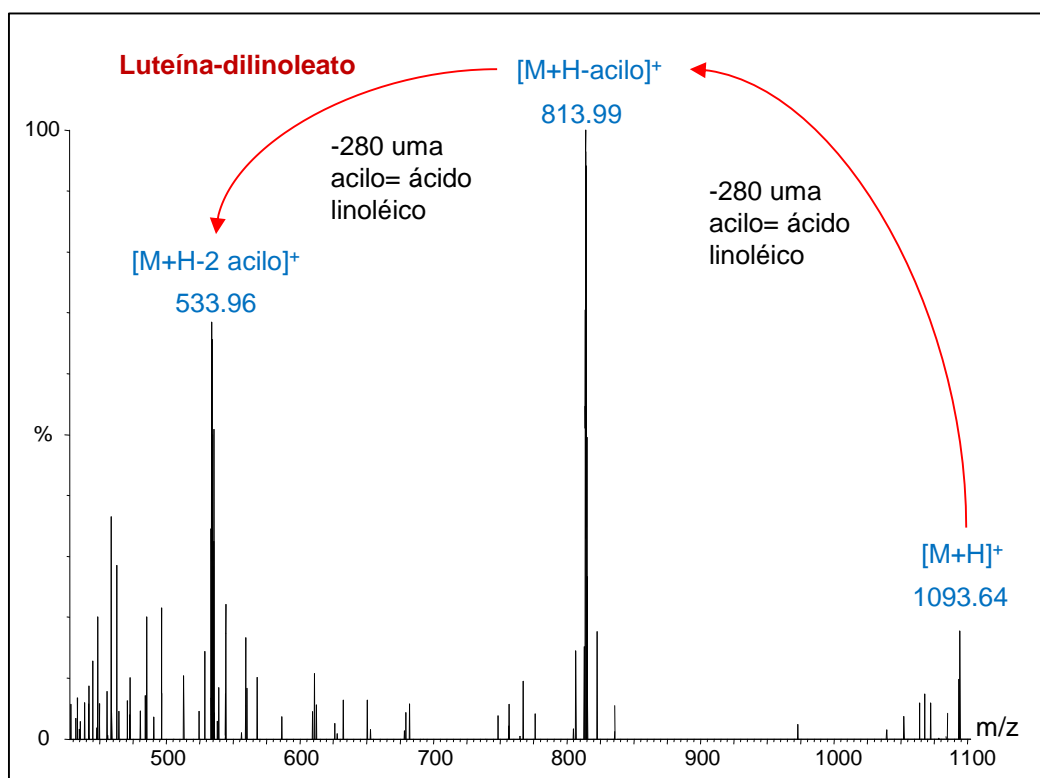


Figura 79. Espectro de masas (APCI, modo positivo) del diéster correspondiente a la fracción luteína diéster 1. Se asigna estructuralmente como luteína dilinoleato.

Como se pone de manifiesto en la **Figura 76**, la **fracción luteína diéster 2** se separó en dos picos cromatográficos ($R_t=49.38$ min y $R_t=50.14$ min, picos F y G respectivamente; **Figura 76**), lo que sugiere que se trata de regiosómeros de un heterodíéster, es decir un diéster en el que los dos grupos acilos son distintos, o de dos diésteres con ácidos grasos diferentes. Al analizar el espectro de masas del primer pico (**Figura 80**) se observó un ión principal a m/z 789.91 (100%), correspondiente a la pérdida de un ácido linoléico ($M_w=280.24$) en la posición 3'-*O* ($[M+H-\text{linoléico}]^+$) y otro más débil a m/z 813.26 resultante de la pérdida en la posición 3'-*O* de un resto de ácido palmítico ($[M+H-\text{palmítico}]^+$). El ión molecular correspondiente $[M+H]^+$ con m/z 1069.45 se observó con baja intensidad. Sin embargo, se mostró muy intenso el ión m/z 533.72 correspondiente con la pérdida ambos grupos acilo ($[M+H-\text{linoléico-palmítico}]^+$). Por lo tanto, en este caso la asignación estructural se correspondió con el diéster luteína-3'-*O*-linoleato-3'-*O*-palmitato. En el caso del segundo pico ($R_t=50.14$ min, G) se observó justo lo contrario, un ión más intenso con m/z 813.46 ($[M+H-\text{palmítico}]^+$), observándose con dificultad el ión correspondiente a m/z 789.62 ($[M+H-$

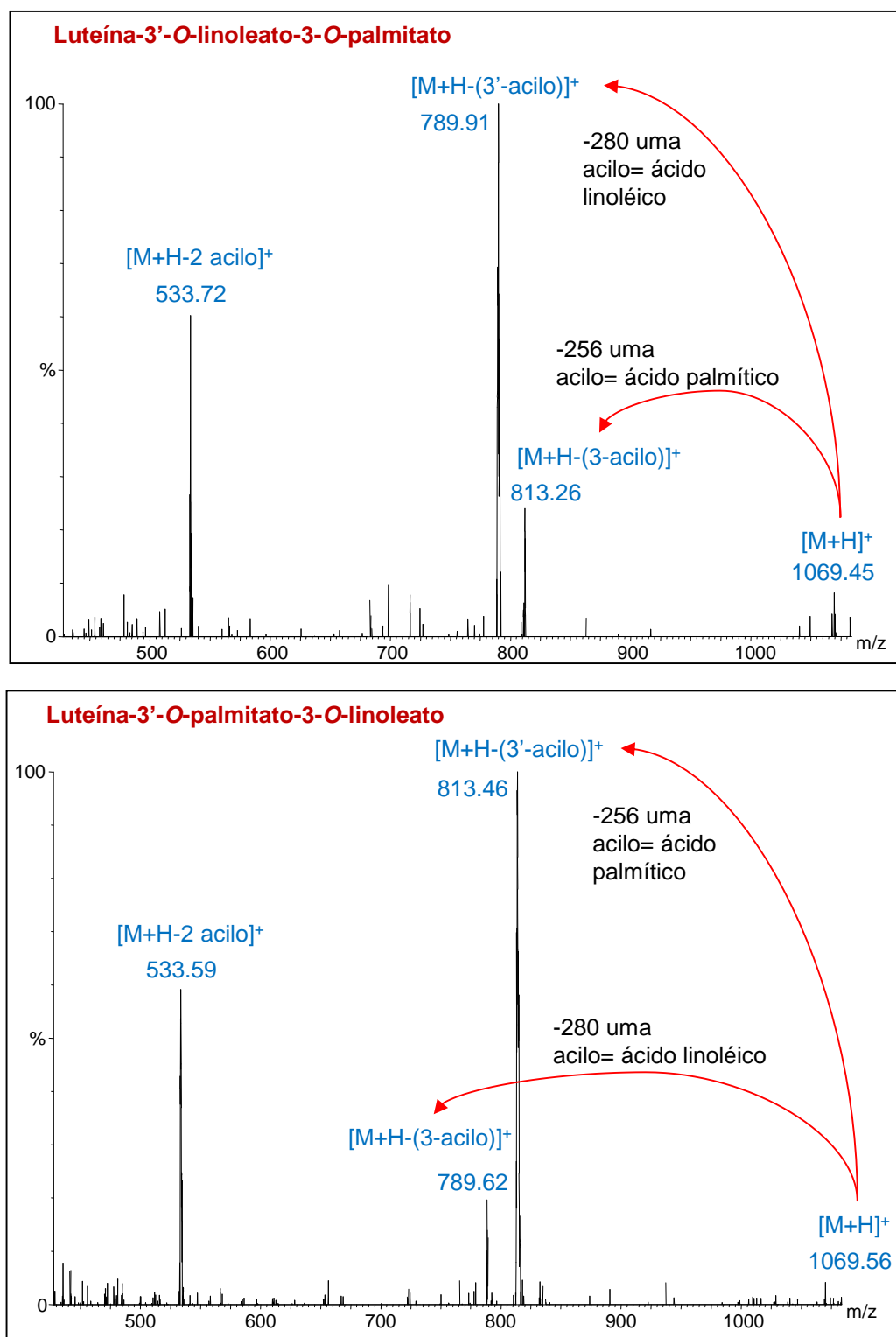


Figura 80. Espectros de masas (APCI, modo positivo) de los regioisómeros de luteína diéster correspondientes a la fracción luteína diéster 2. El pico a 49.38 minutos se asigna estructuralmente como luteína-3'-O-linoleato-3-O-palmitato, y el pico a 50.14 minutos como luteína-3'-O-palmitato-3-O-linoleato.

linoléico]⁺). Además el ión m/z 533.59 correspondiente con la pérdida ambos grupos acilo ($[M+H-\text{linoléico-palmitico}]^+$) se observó con intensidad, lo cual no ocurre para el ión molecular correspondiente $[M+H]^+$ con m/z 1069.56. Este compuesto quedó asignado como el regioisómero luteína-3'-*O*-palmitato-3-*O*-linoleato.

Por último, al analizar la **fracción luteína diéster 3** se observó un sólo pico cromatográfico ($R_t=52.40$ min, pico H; **Figura 76**), lo que nuevamente indicaba una estructura de homodíéster, y consecuentemente se descartó posibilidad de tener regioisómeros. Cuando se analizó el espectro de masas (**Figura 81**) se detectó un ión principal a m/z 789.79 (100%) correspondiente a la pérdida de un grupo acilo ($[M+H-\text{palmitico}]^+$) correspondiente a ácido palmítico ($M_w=256.24$), y otro a m/z 533.72 (65%) correspondiente con la pérdida subsiguiente de otra molécula de ácido palmítico ($[M+H-2 \text{ palmítico}]^+$). No se detectó la presencia del ión molecular que debería aparecer a m/z 1067.87. Por lo tanto, en este caso la asignación estructural se determinó como el diéster luteína-dipalmitato.

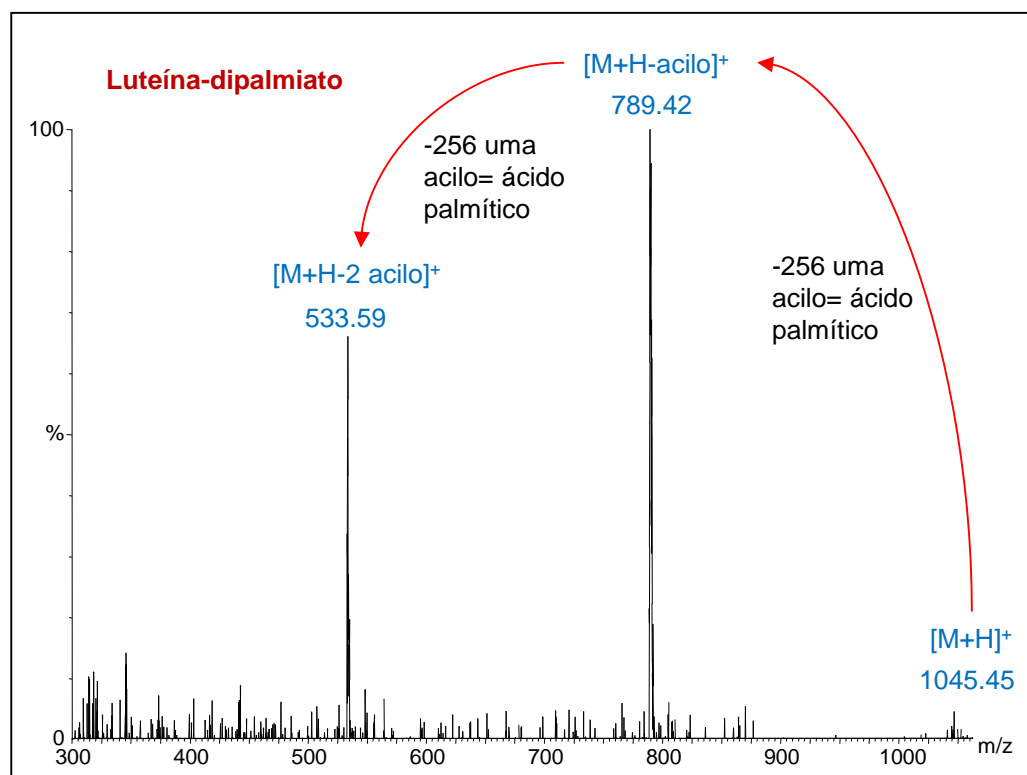


Figura 81. Espectro de masas (APCI, modo positivo) del diéster correspondiente a la fracción luteína diéster 3. Se asigna estructuralmente como luteína dipalmitato.



Como prueba identificativa adicional, se procedió a la síntesis dirigida de ésteres de luteína con los ácidos palmítico y linoléico, tanto de forma aislada como en mezcla de ambos. La **Figura 82** muestra los cromatogramas correspondientes tras la separación de los ésteres sintéticos en la misma columna de fase reversa C18 utilizada para los análisis de las muestras de cereales.

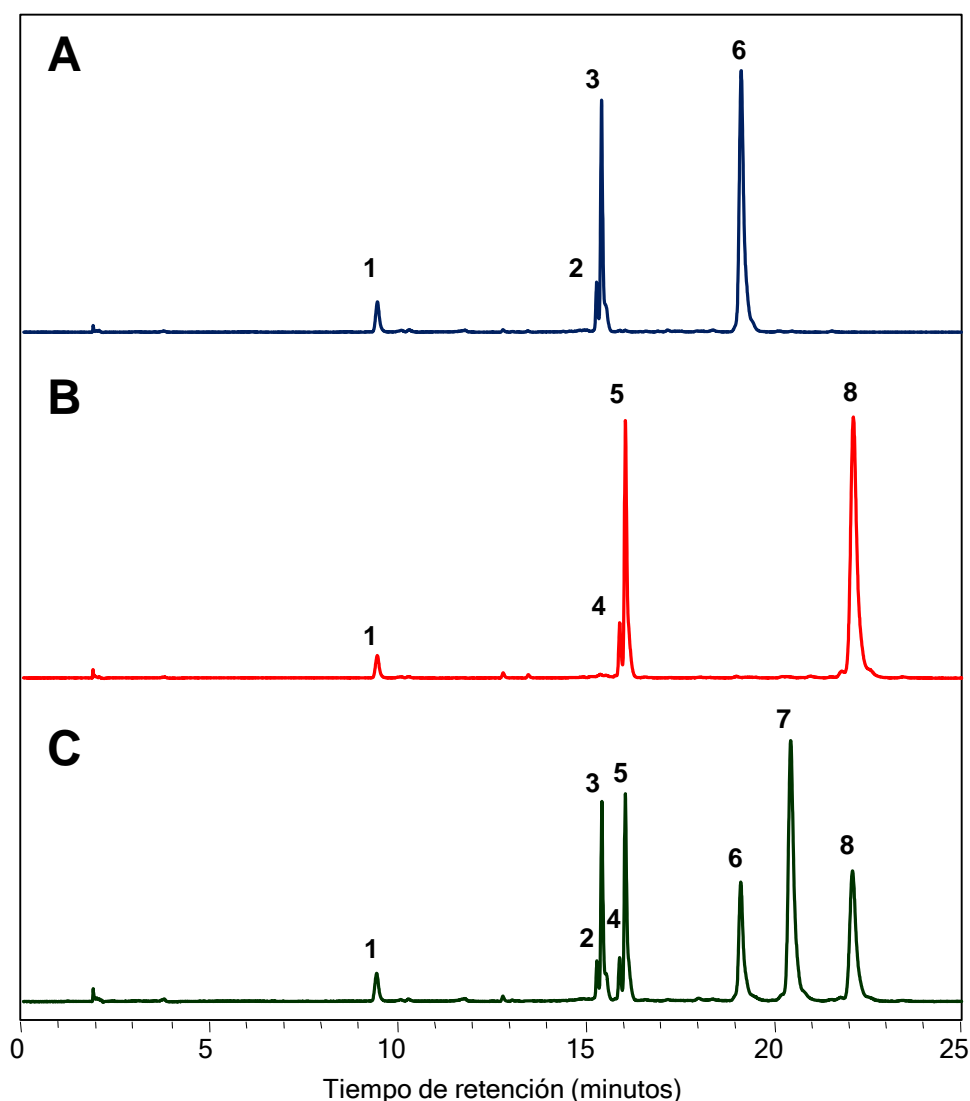


Figura 82. Cromatogramas correspondientes a la separación en fase reversa C18 de los productos resultantes de la esterificación de luteína con ácido linoleico (A), ácido palmítico (B) y la mezcla de ambos ácidos. Identidad de los picos: 1. *all-trans*-luteína; 2. *all-trans*-luteína-3'-*O*-linoleato; 3. *all-trans*-luteína-3-*O*-linoleato; 4. *all-trans*-luteína-3'-*O*-palmitato; 5. *all-trans*-luteína-3-*O*-palmitato; 6. *all-trans*-luteína-3,3'-dilinoato; 7. *all-trans*-luteína-3,3'-linoleatopalmitato (mezcla de *all-trans*-luteína-3'-*O*-linoleato-3-*O*-palmitato y *all-trans*-luteína-3'-*O*-palmitato-3-*O*-linoleato); 8. *all-trans*-luteína-3,3'-dipalmitato. Detección a 450 nm. (Para condiciones de reacción y cromatográficas consultar la sección de Materiales y Métodos).

Tanto los espectros de masas como el comportamiento cromatográfico de los picos resultantes fueron coincidentes con los resultados obtenidos para los ésteres identificados en los extractos de tritordeum. Además, se confirmó la incapacidad de la cromatografía en fase reversa con columna C18 para resolver el par de regioisómeros correspondientes al heteroéster de luteína con ácido palmítico y linoléico. Por el contrario, cuando la mezcla de patrones de ésteres se cromatografió en columna de fase reversa C30, utilizando las condiciones empleada para el aislamiento de los xantofilas esterificadas de tritordeum, se confirmó la capacidad de esta fase para resolver adecuadamente tanto los regioisómeros de monoésteres como de diésteres, incluyendo el par regioisómeros *all-trans*-luteína-3'-*O*-linoleato-3-*O*-palmitato y *all-trans*-luteína-3'-*O*-palmitato-3-*O*-linoleato (**Figura 83**).

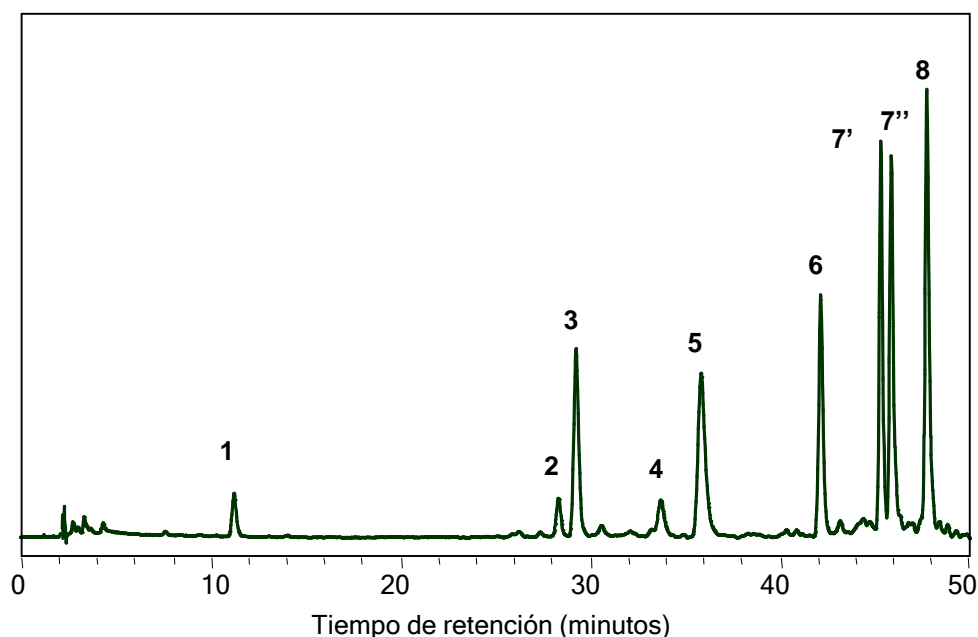


Figura 83. Cromatogramas correspondientes a la separación en fase reversa C30 de los productos resultantes de la esterificación de luteína con ácido linoleico (A), ácido palmítico (B) y la mezcla de ambos ácidos. Identidad de los picos: 1. *all-trans*-luteína; 2. *all-trans*-luteína-3'-*O*-linoleato; 3. *all-trans*-luteína-3-*O*-linoleato; 4. *all-trans*-luteína-3'-*O*-palmitato; 5. *all-trans*-luteína-3-*O*-palmitato; 6. *all-trans*-luteína-3,3'-dilinoato; 7'. *all-trans*-luteína-3'-*O*-linoleato-3-*O*-palmitato; 7''. *all-trans*-luteína-3'-*O*-palmitato-3-*O*-linoleato; 8. *all-trans*-luteína-3,3'-dipalmitato. Detección a 450 nm. (Para condiciones de reacción y cromatográficas consultar la sección de Materiales y Métodos).

La **Tabla 11** resume las características cromatográficas y espectroscópicas de los regioisómeros de ésteres de luteína identificados en tritordeum. Es importante mencionar que al igual que han observado otros autores (Breithaupt *et al.*, 2002; Young *et al.*, 2007)



hemos comprobado en el presente estudio que los ésteres de xantofila obedecen a una serie de reglas cuando son cromatografiados en fase reversa, y que pueden ser utilizados como apoyo a la identificación estructural. Así, el regioisómero en la posición 3'-*O* de un monoéster de luteína con un determinado ácido graso eluye antes que el correspondiente regioisómero en la posición 3-*O*. Para una misma xantofila se conoce que el orden de elución en fase reversa viene determinado por la longitud de la cadena carbonada del ácido graso, de forma que a mayor longitud de la cadena mayor tiempo de retención. En caso de existir ésteres con ácidos grasos insaturados el tiempo de retención del éster se reduce con respecto a su homólogo saturado. Así en nuestro caso, los monoésteres de luteína con ácido linoleico (C18:2) eluyen antes que los monoésteres con palmítico (C16:0). De forma análoga, en el caso de homodíesteres el orden de elución lo determina la longitud de la cadena carbonada y el número de insaturaciones, así por ejemplo los ésteres de linoleico son más polares que los de palmítico. En el caso de los regioisómeros mixtos de luteína, la elución se dará a tiempos de retención intermedios entre los correspondientes homodíesteres. Para el caso particular de los dos regioisómeros de un heterodíéster de luteína, mostrará mayor polaridad aquella forma estructural que presente el sustituyente insaturado o más corto en posición 3'-*O*.

A modo de resumen, las **Figuras 84 y 85** muestran las estructuras de los ésteres de luteína identificadas en tritordeum.

Tabla 11. Características cromatográficas y espectroscópicas (UV-visible and MS (APCI+)) de los regioisómeros de ésteres de luteína identificados en granos de tritordeum (HT621).

Pico ^a	Rt (min)	Identidad	Espectro UV-visible (HPLC-DAD)	[m+H] ⁺	HPLC/APCI(+) MS patrón de fragmentación
			λ_{\max} (nm); [%III/II]	<i>m/z</i>	<i>m/z</i> (abundancia relativa)
A	30.76	Luteína 3'- <i>O</i> -linoleato	424, 447, 476; [65%]	831.30	831.30 (27), 551.41 (100)
B	31.72	Luteína 3- <i>O</i> -linoleato	424, 447, 476; [65%]	831.30	831.30 (12), 813.99 (100), 533.35 (48)
C	36.09	Luteína 3'- <i>O</i> -palmitato	424, 447, 476; [64%]	808.21	808.21 (29), 551.77 (100)
D	38.40	Luteína 3- <i>O</i> -palmitato	424, 447, 476; [64%]	808.90	808.90 (8), 790.04 (100), 533.72 (49)
E	45.88	Luteína dilinoleato	424, 447, 476; [66%]	1093.64	1093.64 (24), 813.99 (100), 533.96 (69)
F	49.38	Luteína 3'- <i>O</i> -linoleato-3- <i>O</i> -palmitato	424, 447, 476; [64%]	1069.45	1069.45 (8), 813.26 (24), 789.91 (100), 533.72 (60)
G	50.14	Luteína 3'- <i>O</i> -palmitato- 3- <i>O</i> -linoleato	424, 447, 476; [64%]	1069.45	1069.56 (4), 813.46 (100), 789.62 (16), 533.59 (60)
H	52.40	Luteína dipalmitato	424, 447, 476; [65%]	1045.45	1045.45 (5), 789.42 (100), 533.59 (65)

a. La denominación de los picos se corresponde con la Figura 76.

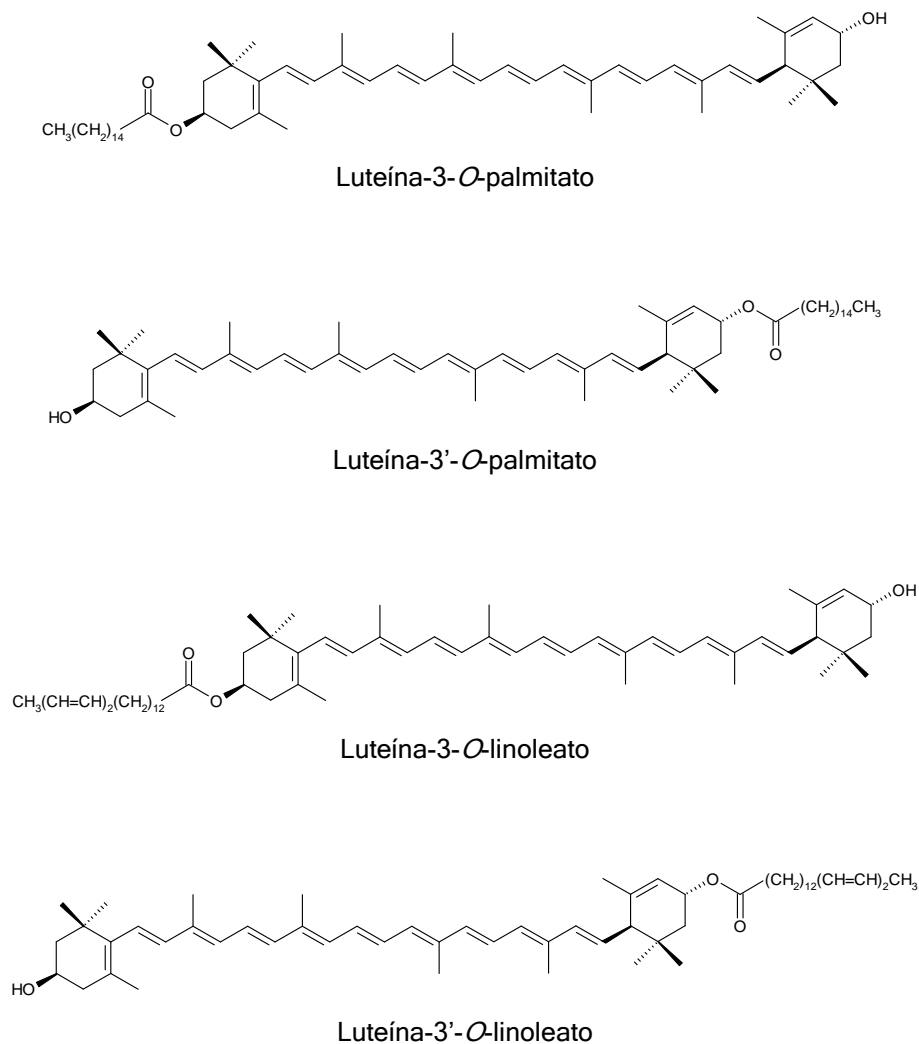


Figura 84. Estructura de los distintos regioisómeros de monoésteres de luteína presentes en tritordeum.

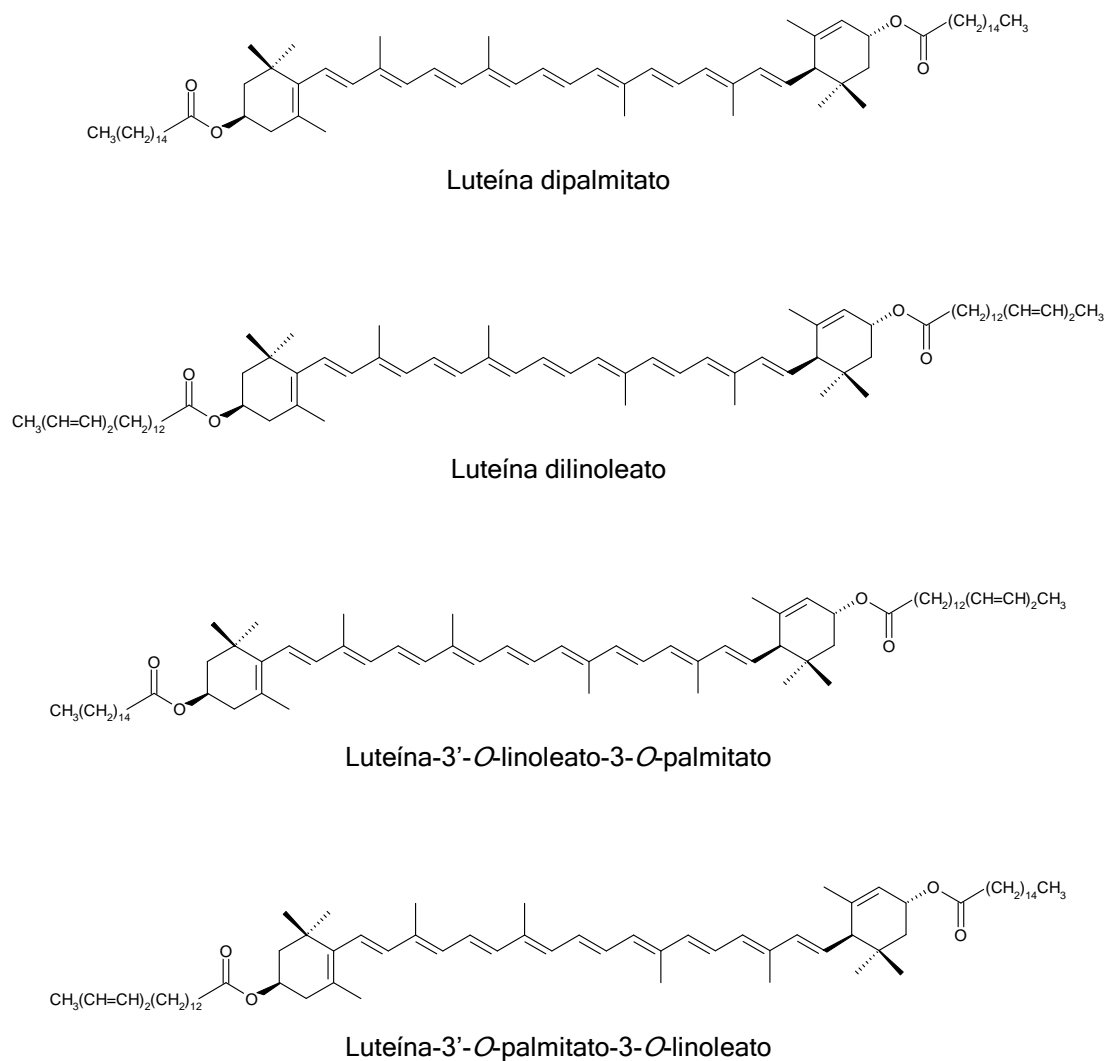


Figura 85. Estructura de homodímeros y regioisómeros de diésteres de luteína presentes en tritordeum.

5.2. Composición cualitativa y cuantitativa de pigmentos carotenoides en granos de trigo y tritordeum.

La **Figura 86** muestra con claridad la diferencia cuantitativa entre ambos grupos de muestras. Los datos de contenido y composición de pigmentos carotenoides obtenidos para las muestras de trigo duro y tritordeum que han sido caracterizadas en el presente trabajo fueron consistentes con los resultados que se obtuvieron en un estudio anterior en nuestro laboratorio (Atienza *et al.*, 2007b), observándose un contenido de carotenoides total superior para las líneas de tritordeum con respecto a las variedades de trigo duro. No obstante, en el presente estudio se ha avanzado significativamente, completando totalmente la caracterización individual de las formas de esterificación de xantofilas en tritordeum.

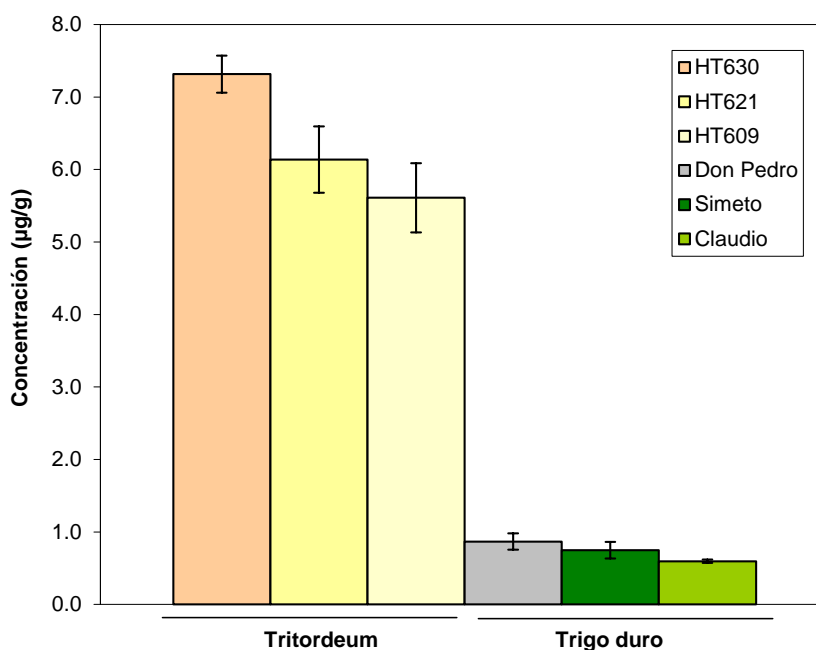


Figura 86. Contenido carotenoides total (µg/g) presente en granos de las variedades de trigo duro (Don Pedro, Simeto y Claudio) y de las líneas avanzadas de tritordeum (HT630, HT621 y HT609). Los valores representados corresponden a la media y la desviación estándar de seis análisis (n=6).

En la **Tabla 12** se detalla la composición cualitativa y cuantitativa de pigmentos carotenoides en los granos de los dos tipos de cereales estudiados. El contenido carotenoides total medio fue de 0.737 ± 0.144 µg/g y 6.354 ± 0.832 µg/g, para trigos duros y tritordeum, respectivamente, lo cual representa un contenido 8.5 veces superior para tritordeum con respecto a trigo duro.



En el grupo de líneas de tritordeum destacó HT630 por su mayor contenido carotenoide total ($7.315 \pm 0.256 \mu\text{g/g}$; $p < 0.05$). En el caso del grupo de trigos duros, fueron las variedades Don Pedro y Simeto las que presentaron un contenido carotenoide total superior ($p < 0.05$). Como ya se ha puesto de manifiesto en el apartado de identificación y caracterización, el pigmento mayoritario para ambos tipos de cereales fue luteína, alcanzando valores del 86-88 y 98-99% (expresado como suma de las formas libres y esterificadas) para los trigos duro y tritordeum, respectivamente. De forma comparativa, tal y como se ha comentado en el apartado de identificación, cabe destacar como carácter diferenciador la presencia de zeaxanteno y α -caroteno en la muestras de trigo duro, y la ausencia de los mismos en las muestras de tritordeum. Por el contrario, en los trigos estudiados las xantofilas no experimentaron esterificación alguna. El contenido medio de zeaxanteno en las muestras de trigo duro fue unas 6.8 veces inferior al de luteína total, mientras que los niveles α - y β -caroteno pueden ser considerados trazas con respecto a los de luteína. Este último dato evidencia, una vez más, la necesidad de una revisión de determinados estudios que mediante el uso de métodos analíticos inadecuados y no selectivos han establecido la presencia de β -caroteno como pigmento mayoritario en cereales, con las consecuentes implicaciones nutricionales que de ello se derivan. Sin lugar a dudas, la diferenciación más clara en ambos tipos de cereales es la presencia de ésteres de luteína en tritordeum, y su ausencia en trigo duro, aunque como se mencionará más adelante no es exclusivo de tritordeum y puede aparecer en trigo duro en determinadas condiciones. La **Figura 87** muestra un esquema simplificado de la ruta de biosíntesis de carotenoides en granos de trigo duro y tritordeum.

En la **Tabla 13** se muestra la composición porcentual de luteína libre y formas monoesterificadas y diesterificadas para las líneas de tritordeum estudiadas. Como puede observarse la fracción esterificada se encuentra en el rango del 11-20%, siendo mayoritaria la fracción de monoésteres (hasta un 19.71% en la línea HT630). Cabe destacar que la línea de tritordeum con mayor contenido carotenoide, HT630, también presenta la proporción más alta de xantofilas esterificadas, lo cual apoya la hipótesis de que la esterificación facilita una mayor acumulación de carotenoides en los vegetales (Hornero-Méndez y Mínguez-Mosquera, 2000). A modo de resumen, en la **Figura 88** se representa la distribución media de las fracciones de luteína libre y esterificada (monoésteres y diésteres) en los granos de tritordeum.

Tabla 12. Composición cualitativa y cuantitativa ($\mu\text{g/g}$) de pigmentos carotenoides presentes en granos de trigo duro y tritordeum*.

Pigmento**	Tritordeum			Trigo duro		
	HT630	HT621	HT609	Don Pedro	Simeto	Claudio
all- <i>trans</i> -Zeaxanteno	-	-	-	0.097 ± 0.009^a	0.076 ± 0.007^b	0.060 ± 0.003^c
all- <i>trans</i> -Luteína	5.116 ± 0.209^a	4.716 ± 0.341^a	4.059 ± 0.380^b	0.622 ± 0.098^a	0.545 ± 0.095^a	0.433 ± 0.019^b
9- <i>cis</i> -Luteína	0.265 ± 0.009^a	0.218 ± 0.010^b	0.194 ± 0.008^c	0.048 ± 0.002^a	0.044 ± 0.006^a	0.032 ± 0.002^b
13- <i>cis</i> -Luteína	0.429 ± 0.015^a	0.423 ± 0.033^a	0.346 ± 0.028^b	0.074 ± 0.004^a	0.066 ± 0.006^b	0.053 ± 0.002^c
Luteína monolinoleato	0.492 ± 0.016^a	0.197 ± 0.026^b	0.256 ± 0.013^c	-	-	-
Luteína-3'- <i>O</i> -linoleato	0.089 ± 0.002^a	0.041 ± 0.008^b	0.053 ± 0.003^c	-	-	-
Luteína-3- <i>O</i> -linoleato	0.403 ± 0.015^a	0.156 ± 0.018^b	0.203 ± 0.013^c	-	-	-
Luteína monopalmitato	0.809 ± 0.025^a	0.491 ± 0.044^b	0.602 ± 0.035^c	-	-	-
Luteína-3'- <i>O</i> -palmitato	0.243 ± 0.009^a	0.149 ± 0.021^b	0.180 ± 0.017^c	-	-	-
Luteína-3- <i>O</i> -palmitato	0.566 ± 0.002^a	0.342 ± 0.023^b	0.439 ± 0.021^c	-	-	-
Luteína dilinoleato	0.016 ± 0.005^a	0.003 ± 0.000^b	0.006 ± 0.000^b	-	-	-
Luteína linoleatopalmitato	0.054 ± 0.006^a	0.011 ± 0.003^b	0.022 ± 0.001^c	-	-	-
Luteína dipalmitato	0.055 ± 0.007^a	0.017 ± 0.004^b	0.034 ± 0.002^c	-	-	-
α -Caroteno	-	-	-	0.010 ± 0.001^a	0.005 ± 0.001^b	0.009 ± 0.003^a
β -Caroteno	0.080 ± 0.003^a	0.061 ± 0.004^b	0.067 ± 0.005^b	0.017 ± 0.001^a	0.013 ± 0.001^a	0.009 ± 0.002^b
Luteína total	7.235 ± 0.253^a	6.076 ± 0.454^b	5.542 ± 0.473^b	0.743 ± 0.103^a	0.655 ± 0.107^a	0.519 ± 0.019^b
Carotenoides totales	7.315 ± 0.256^a	6.137 ± 0.458^b	5.610 ± 0.478^b	0.867 ± 0.113^a	0.749 ± 0.115^a	0.596 ± 0.023^b
Monoésteres totales	1.301 ± 0.043^a	0.688 ± 0.069^b	0.882 ± 0.054^c	-	-	-
Diésteres totales	0.124 ± 0.018^a	0.031 ± 0.007^b	0.061 ± 0.004^c	-	-	-
Esteres totales	1.425 ± 0.054^a	0.719 ± 0.075^b	0.944 ± 0.057^c	-	-	-

*La tabla representa los valores medios y la desviación estándar para seis replicados.

**Para cada pigmento, y con respecto a cada tipo de muestra (trigo duro o tritordeum), los valores que muestran distinto superíndice presentan diferencias significativas (test Duncan, $p < 0.05$).

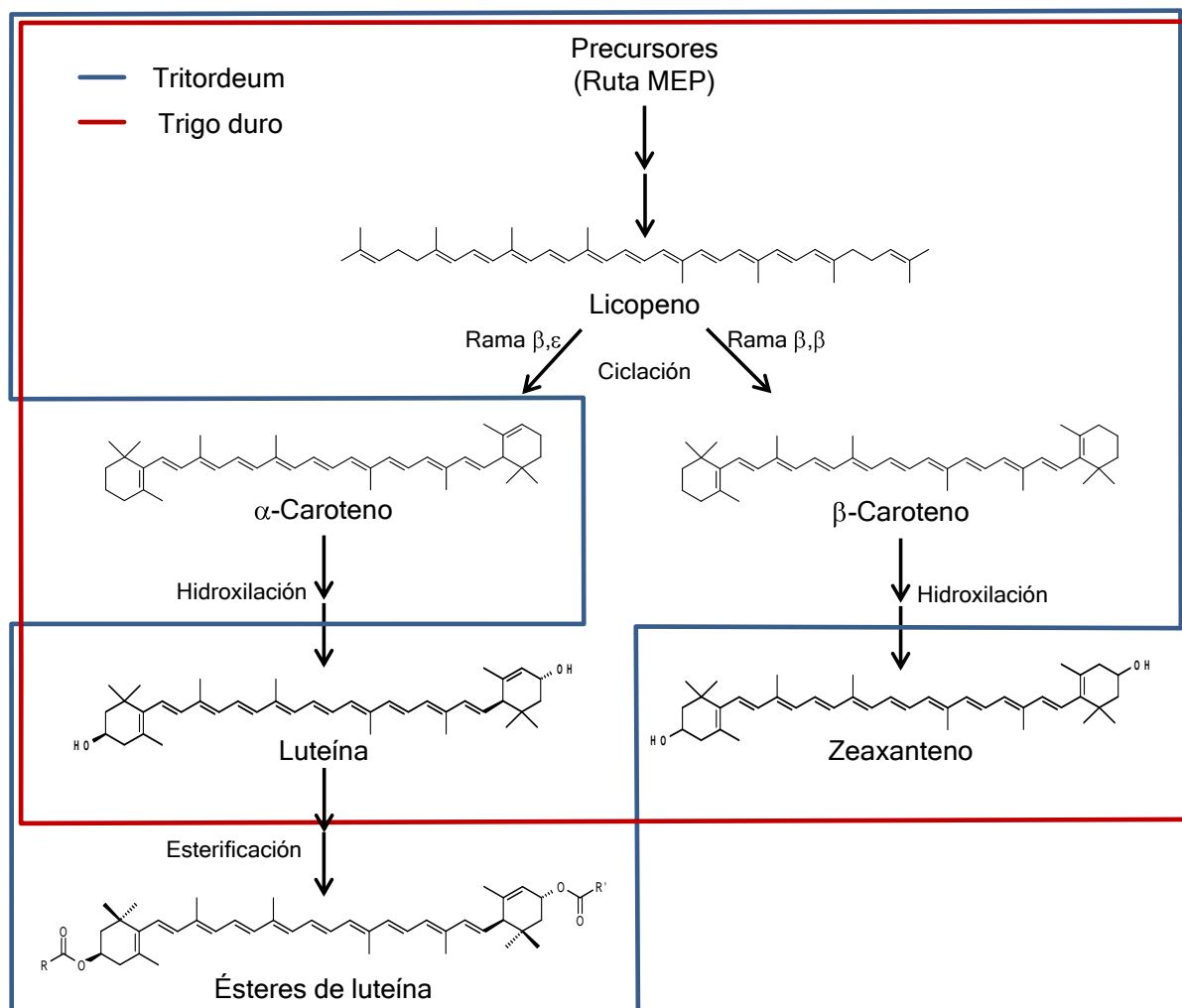


Figura 87. Ruta de biosíntesis y perfil de carotenoides en granos de trigo duro (—) y tritordeum (—).
Nota: Licopeno no se acumula en los granos de cereales, actuando como precursor/intermediario de la ruta.

Tabla 13. Composición relativa (%) entre las formas libres y esterificadas de luteína en tritordeum*.

Tritordeum	Luteína libre	Luteína monoesterificada	Luteína diesterificada	Total ésteres
HT630	80.29 ± 0.73 ^a	18.00 ± 0.48 ^a	1.71 ± 0.27 ^a	19.71 ± 0.73 ^a
HT621	88.18 ± 0.35 ^b	11.31 ± 0.30 ^b	0.50 ± 0.09 ^b	11.82 ± 0.35 ^b
HT609	82.94 ± 0.46 ^c	15.94 ± 0.43 ^c	1.12 ± 0.04 ^c	17.06 ± 0.46 ^c

*La tabla representa los valores medios y la desviación estándar para seis replicados.

**Para cada fracción de pigmentos los valores que muestran distinto superíndice presentan diferencias significativas (test Duncan, $p < 0.05$).

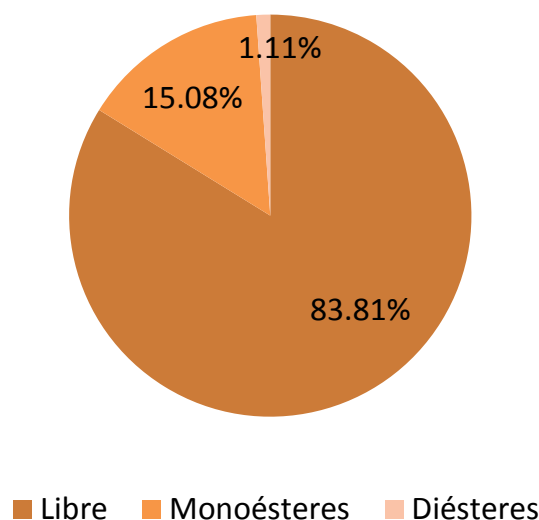


Figura 88. Distribución media de las fracciones de luteína libre y esterificada (monoésteres y diésteres) en granos de tritordeum.

Debemos mencionar, que los valores encontrados para las fracciones esterificadas en el presente estudio, son significativamente inferiores a los que se hallaron en un estudio que realizamos con anterioridad (Atienza *et al.*, 2007a) en el que se alcanzaron valores del 23-65% de esterificación en tritordeum. Sin embargo, existe una gran diferencia entre ambos estudios en la que podría residir la razón para tal disimilitud. Así, en el presente experimento los granos de cereal, tanto tritordeum como trigo duro, fueron analizados inmediatamente después de ser recolectados tras alcanzar la maduración, mientras que los granos analizados por Atienza *et al.*, (2007b) habían estado almacenados durante varios años, llegándose incluso a detectar esterificación en trigo duro, aunque a niveles inferiores que en tritordeum. Esta observación, apoya la idea de que sea durante el periodo de



almacenamiento de los granos cuando acontece la esterificación de luteína, aspecto sobre el cual volveremos a insistir posteriormente en la presente memoria.

Resulta de particular interés el estudio comparado de las fracciones monoesterificadas, encontrándose que la relación entre las formas regioisoméricas 3/3' (ratio 3/3'; ratio luteína-3-*O*-acilo a luteína-3'-*O*-acilo) de cada tipo de monoéster mostró valores medios de 2.35 y 4.05, para los ésteres con ácidos palmítico y linoléico, respectivamente. Este hecho sugiere claramente que las enzimas involucradas en la acilación *in vivo* de luteína, presentan una acción preferencial sobre el grupo hidroxilo situado en la posición 3 del anillo β - en comparación al situado en la posición 3' del anillo ε -. Khachik *et al.*, (1988) propusieron que la esterificación predominante del grupo hidroxilo del anillo β - de luteína se deba probablemente a que en el caso del anillo ε - existe una deslocalización electrónica del doble enlace situado en dicho anillo, de tal forma que el grupo hidroxilo en posición alílica respecto a este doble enlace (posición 3') es menos reactivo que el grupo hidroxilo del anillo β -. Esta afirmación, también está en consonancia con la relación 2:1 descrita por Young *et al.*, (2007) para el ratio 3/3' en un estudio de caracterización de ésteres de luteína producidos mediante síntesis dirigida. Como se recordará, durante la identificación y caracterización de los regioisómeros de luteína en tritordeum (ver apartado 5.1.2) se procedió a la esterificación química de luteína con los ácidos linoléico y palmítico, y tal y como se puede observar en las **Figuras 82 y 83**, para ambos ácidos grasos se confirma la misma pauta de selectividad, alcanzándose valores de 4.2-4.6 para el ratio 3/3'. Así mismo, si observamos los cromatogramas (**Figura 76**) resultantes del aislamiento de las fracciones esterificadas nativas de tritordeum (línea HT630), previo a su caracterización, se puede constatar como en el caso de las fracciones 1 y 2 de monoésteres, correspondientes a los monoésteres con ácido linoléico y palmítico respectivamente, se obtuvieron ratios 3/3' en el rango 2.3-2.8. En cualquier caso, se puede afirmar que la formación de monoésteres de luteína, tanto por reacción química como por mediación enzimática, se realiza de forma preferencial sobre el grupo hidroxilo de la posición 3 sobre el anillo β -. Además, se observó que en términos cuantitativos, los monoésteres de luteína con ácido palmítico se encontraron en concentraciones superiores (más del 50%) a los correspondientes con ácido linoléico, tanto en término globales como a nivel de los correspondientes regioisómeros (luteína-3-*O*-acilo y luteína-3'-*O*-acilo), sugiriendo una actividad aciltransferasa preferencial sobre ácido palmítico. Este hallazgo fue también confirmado para las fracciones de diésteres siendo mayoritario el diéster luteína-dipalmitato, seguido de cerca del heterodíéster luteína linoleato-palmitato (suma de dos regioisómeros), y en menor concentración luteína dilinoleato. Con respecto al heterodíéster luteína linoleato-palmitato el análisis cromatográfico mediante HPLC en fase

reversa C18 no nos permitió la separación de los dos regioisómeros coeluyentes (luteína 3'-*O*-linoleato-3-*O*-palmitato y luteína 3'-*O*-palmitato-3-*O*-linoleato), cuantificándose de forma conjunta. No obstante, se pudo deducir, a partir del fraccionamiento de este pico mediante cromatografía en fase reversa C30 (ver **Figura 76**, fracción diéster 2), que el regioisómero mayoritario fue aquel que presentaba la esterificación con palmítico en la posición 3 (aproximadamente el 65%), el cual se debe formar preferentemente mediante la introducción de un resto de ácido linoleico en la posición 3' libre del monoéster luteína 3-*O*-palmitato o de manera análoga mediante la incorporación de un resto de ácido palmítico a la posición 3' libre del monoéster luteína 3'-*O*-linoleato. Teniendo en cuenta estos aspectos, la **Figura 89** esquematiza las distintas posibilidades de formación de los regioisómeros de ésteres de luteína encontrados en tritordeum.

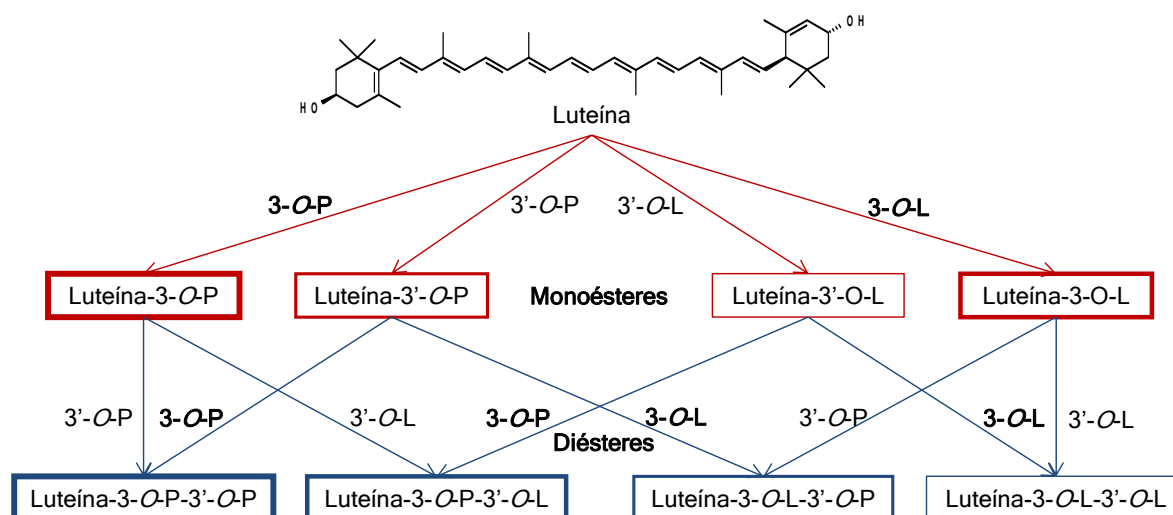


Figura 89. Rutas de formación de regioisómeros de monoésteres y diésteres de luteína con ácidos palmítico (P) y linoleico (L). 3-*O*-P: incorporación de ácido palmítico en la posición 3; 3'-*O*-P: incorporación de ácido palmítico en la posición 3'; 3-*O*-L: incorporación de ácido linoleico en la posición 3; 3'-*O*-L: incorporación de ácido linoleico en la posición 3'. El grosor de la línea de los recuadros se correlaciona con la frecuencia de aparición del éster. Las incorporaciones en la posición 3 se resaltan en negrilla al ser más probables.

Finalmente, al objeto de valorar el alcance quimiotaxonómico de las diferencias encontradas a nivel de composición carotenoide entre trigo duro y tritordeum, se procedió a realizar un Análisis de Componentes Principales (PCA) utilizando la matriz de datos correspondiente a los 13 pigmentos individuales analizados en ambas cereales. Este tipo de análisis estadístico es una técnica bien conocida por aportar una visión simplificada de conjuntos de datos complejos y multidimensionales, generando un conjunto de nuevas

variables ortogonales denominados Componentes Principales (PCs), los cuales son generados por combinación lineal de las variables originales (en nuestro caso los diferentes pigmentos) de tal forma que la máxima variación de los datos originales sea explicada por las nuevas variables (PCs). Por ello, el PCA es muy apropiado para la reducción/simplificación de matrices de datos grandes, como las generadas en la caracterización fitoquímica de productos vegetales, eliminando aquellos componentes principales no significativos y facilitando análisis sucesivos sobre los datos reducidos. La **Tabla 14** muestra la contribución de cada uno de los 13 componentes principales generados (PCs) a explicar la variación del conjunto de datos, la variación explicada acumulada y el valor propio de cada componente (Eigenvalues).

Tabla 14. Análisis de componentes principales (PCA). Valores propios (Eigenvalue), varianza explicada (%), varianza explicada acumulada (%) y valores propios acumulados (Eigenvalue).

Componente (PC)	Valor propio (Eigenvalue)	Varianza explicada (%)	Valor propio acumulado (Eigenvalue)	Varianza explicada acumulada (%)
1	11.88273	91.40562	11.88273	91.4056
2	0.76159	5.85841	12.64432	97.2640
3	0.19007	1.46208	12.83440	98.7261
4	0.08720	0.67076	12.92159	99.3969
5	0.04532	0.34863	12.96692	99.7455
6	0.02332	0.17936	12.99023	99.9249
7	0.00459	0.03528	12.99482	99.9601
8	0.00282	0.02168	12.99764	99.9818
9	0.00101	0.00777	12.99865	99.9896
10	0.00069	0.00531	12.99934	99.9949
11	0.00035	0.00266	12.99968	99.9976
12	0.00022	0.00171	12.99991	99.9993
13	0.00009	0.00073	13.00000	100.0000

Tal y como se observa en la **Tabla 14**, la simple reducción a dos componentes principales (PC1 y PC2) fue suficiente para explicar el 97.26% de la variación de los datos de las 13 pigmentos analizados (variables originales). Concretamente el componente PC1 explicó el 91.40% de la variación del conjunto de datos y el PC2 explicó un 5.86% adicional. La **Tabla 15** muestra la contribución (loading) de cada variable a la expresión global de los componentes PC1 y PC2. La **Figura 90** muestra la proyección de la contribución de cada



variable (autovectores) sobre el plano definido por los componentes principales PC1 y PC2. Estas proyecciones nos permiten visualizar las variables en el plano y las correspondientes correlaciones de tal forma que dos variables estarán menos correlacionadas cuanto más cercano a 90° sea el ángulo formado por los correspondientes vectores, de manera análoga dos variable con vectores en direcciones opuestas estarán inversamente relacionadas. Como se puede comprobar, el componente PC1 está fuertemente correlacionado con todas las formas de luteína presentes, tanto libres como esterificadas (estas últimas características de tritordeum), mientras que está correlacionado negativamente con la presencia de zeaxanteno y α -caroteno, encontrados exclusivamente en las muestras de trigo duro. El componente PC2 muestra una clara correlación positiva con los contenidos de luteína libre (isómeros *cis* y *trans*) y una evidente correlación negativa con los niveles de zeaxanteno y α -caroteno, así como con las formas esterificadas de luteína, especialmente con los diésteres.

Tabla 15. Contribución de cada variable a los componentes principales seleccionados (PC1 y PC2).

Variable (Concentración de pigmento)	Componente PC1	Componente PC2
all- <i>trans</i> -Zeaxanteno	-0.910402	-0.305559
all- <i>trans</i> -Luteína	0.970507	0.198980
9- <i>cis</i> -Luteína	0.983544	0.115732
13- <i>cis</i> -Luteína	0.959968	0.230751
Luteína-3'- <i>O</i> -linoleato	0.990221	-0.108437
Luteína-3- <i>O</i> -linoleato	0.979304	-0.184071
Luteína-3'- <i>O</i> -palmitato	0.997009	0.023810
Luteína-3- <i>O</i> -palmitato	0.995861	0.027857
Luteína dilinoleato	0.922283	-0.378521
Luteína linoleatopalmitato	0.967465	-0.230111
Luteína dipalmitato	0.881502	-0.439690
α -Caroteno	-0.874038	-0.342301
β -Caroteno	0.984985	0.091020

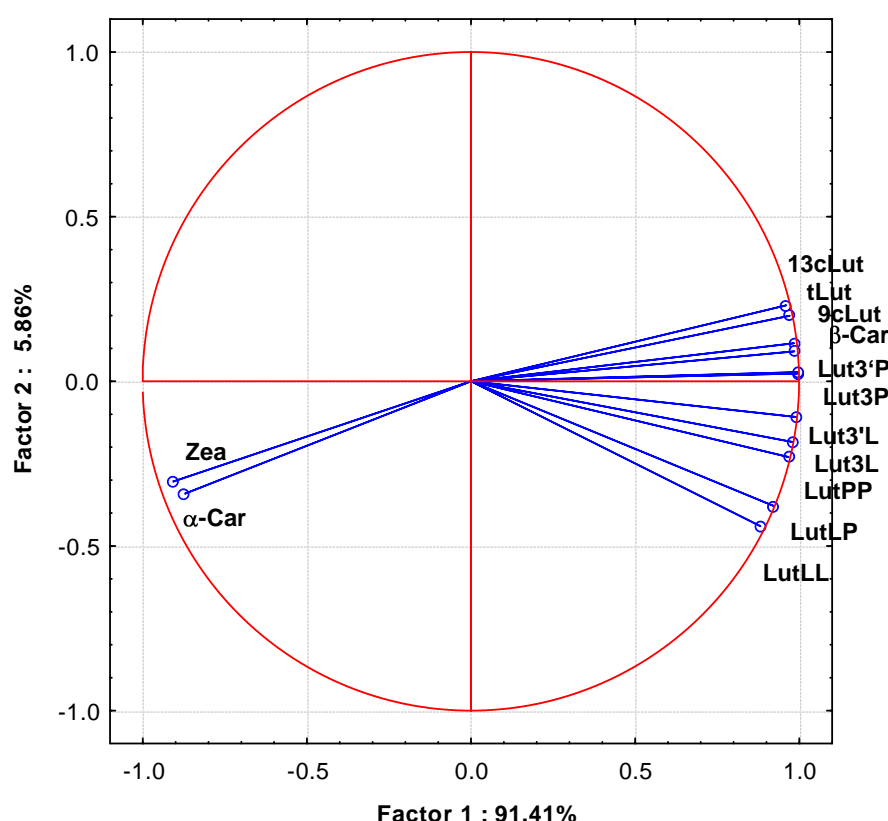


Figura 90. Proyecciones de los autovectores de cada variable sobre el plano definido por los componentes principales PC1 y PC2. Zea: all-*trans*-Zeaxanteno; tLut: all-*trans*-Luteína; 9cLut: 9-*cis*-Luteína; 13cLut: 13-*cis*-Luteína; Lut3'L: Luteína-3'-*O*-linoleato; Lut3L: Luteína-3-*O*-linoleato; Lut3'P: Luteína-3'-*O*-palmitato; Lut3P: Luteína-3-*O*-palmitato; LutLL: Luteína dilinoleato; LutLP: Luteína linoleatopalmitato; LutPP: Luteína dipalmitato; α-Car: α-Caroteno; β-Car: β-Caroteno.

El gran ángulo encontrado definido entre los vectores de zeaxanteno y α-caroteno con el resto de vectores evidencia una correlación inversa entre los niveles de concentración correspondientes a cada pigmento. Así por ejemplo, variedades con alto contenido en luteína (tritordeum) presentaran muy bajo contenido en zeaxanteno y α-caroteno, y viceversa. De igual modo las variedades con presencia destacada de ésteres de luteína, tendrán niveles bajos de ambos pigmentos (tritordeum). La **Figura 91** muestra claramente la separación y agrupamiento que se obtiene de las variedades estudiadas mediante el análisis de componentes principales realizado, evidenciando la utilidad quimiotaconómica de los pigmentos estudiados para diferenciar ambos tipos de cereales.

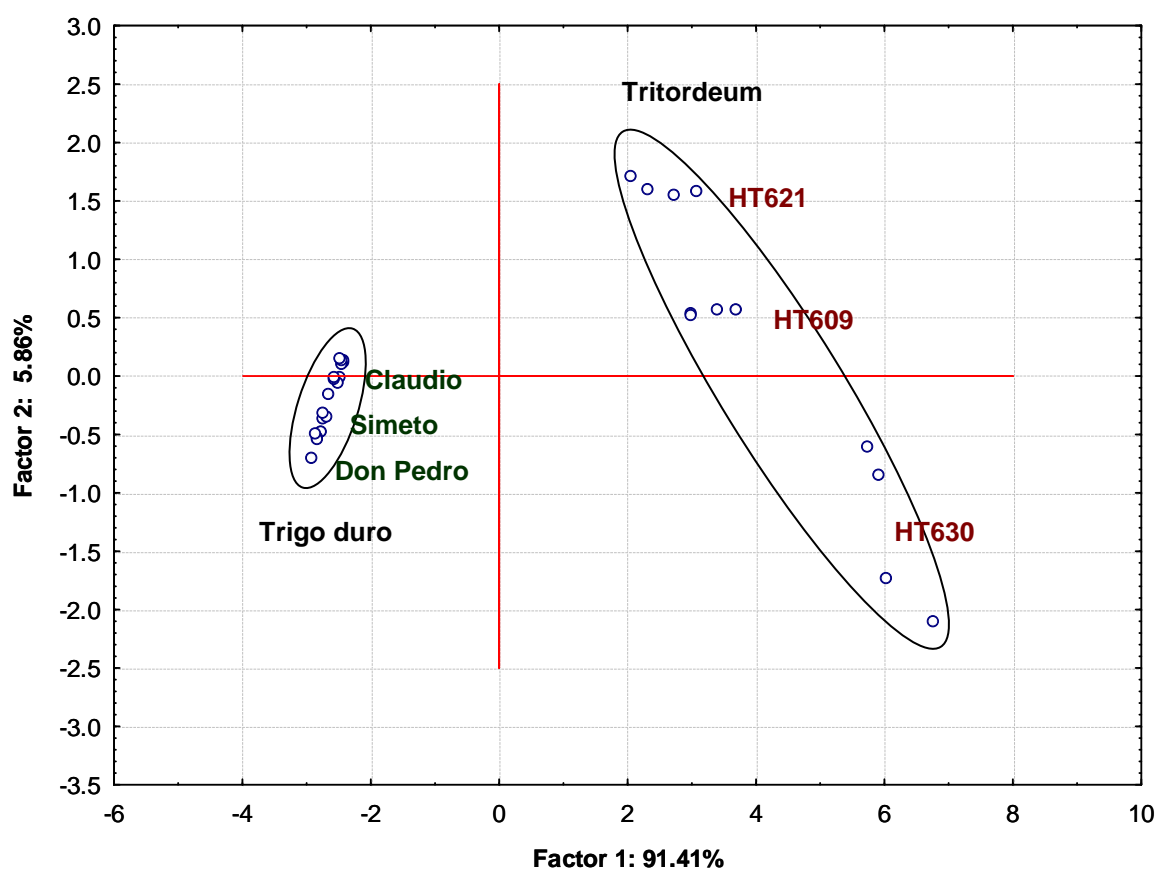


Figura 91. Análisis de componentes principales (PCA) del contenido de pigmentos carotenoides individuales en trigo duro y tritordeum. Representación de los factores PC1 y PC2.



5.3. Relación entre la composición de ácidos grasos en lípidos totales y esterificación de xantofilas en tritordeum.

La **Figura 92** muestra los cromatogramas obtenidos mediante cromatografía de gases (GC) para la variedad de trigo duro Don Pedro y la línea HT630 de tritordeum, así como la mezcla patrón de ácidos grasos utilizada para la identificación de dicho perfil. Para las restantes muestras los cromatogramas que se obtuvieron fueron similares. En la **Tabla 16** se detalla la composición de ácidos grasos correspondiente a la fracción de lípidos totales para el conjunto de variedades y líneas de trigo duro y tritordeum estudiadas. Como se deduce de los datos obtenidos, en términos relativos la composición es prácticamente idéntica para trigos y tritordeum, aunque en éstos últimos el contenido de ácidos grasos totales es ligeramente superior. En ambos casos, trigos duros y tritordeum, el ácido graso mayoritario fue linoléico (C18:2) (55-57%), seguido de ácido palmítico (C16:0) (20-23%) y ácido oleico (C18:1) (13-16%). En menor proporción se encontraron el ácido linolénico (C18:3) (3.0-4.5%) y esteárico (C18:0) (1.7-1.8%). El resto de ácidos grasos pueden ser considerados como minoritarios (contenido menor de 1%). Estos datos están en total acuerdo con los encontrados en estudios previos en trigo panadero y harinas (Arunga y Morrison, 1971; Clayton y Morrison, 1972; Hidalgo *et al.*, 2009a).

Como se ha demostrado en el apartado anterior, los ácidos grasos involucrados en la esterificación de luteína en el endospermo de los granos de tritordeum son palmítico y linoléico, no habiéndose identificado la presencia de otros ácidos grasos en la fracción de xantofilas esterificadas. Ello indica para el presente estudio una correlación directa entre la naturaleza de esterificación de las xantofilas (luteína en el caso de tritordeum) y la naturaleza de los ácidos grasos mayoritarios de la fracción de lípidos, o lo que es equivalente los ácidos grasos que intervienen en la esterificación de luteína en el endospermo de tritordeum son aquellos que se presentan en mayor proporción en el pool de ácidos grasos del grano de cereal. Este hallazgo contrasta claramente con otros estudios similares realizados en frutos y vegetales (por ejemplo pimiento rojo (*Capsicum annuum*) y pétalos de marigold (*Tagetes erecta*)), en los cuales los ácidos grasos que esterifican a las xantofilas no se corresponden con los que son mayoritarios en la fracción de lípidos totales (Gregory *et al.*, 1986; Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez, 1994b; Breithaupt y Schwack, 2000; Breithaupt *et al.*, 2002). De este modo, en el caso de frutos de pimiento rojo, los ácidos grasos mayoritarios son linoléico y linolénico (48 y 22%, respectivamente), mientras que las xantofilas del pimiento (en especial capsanteno, capsorrubeno, zeaxanteno y β -criptoxanteno) se esterifican exclusivamente con los ácidos laúrico, mirístico y palmítico, cuyos contenidos en la fracción de lípidos está en torno a 0.5, 2.5 y 15%, respectivamente.

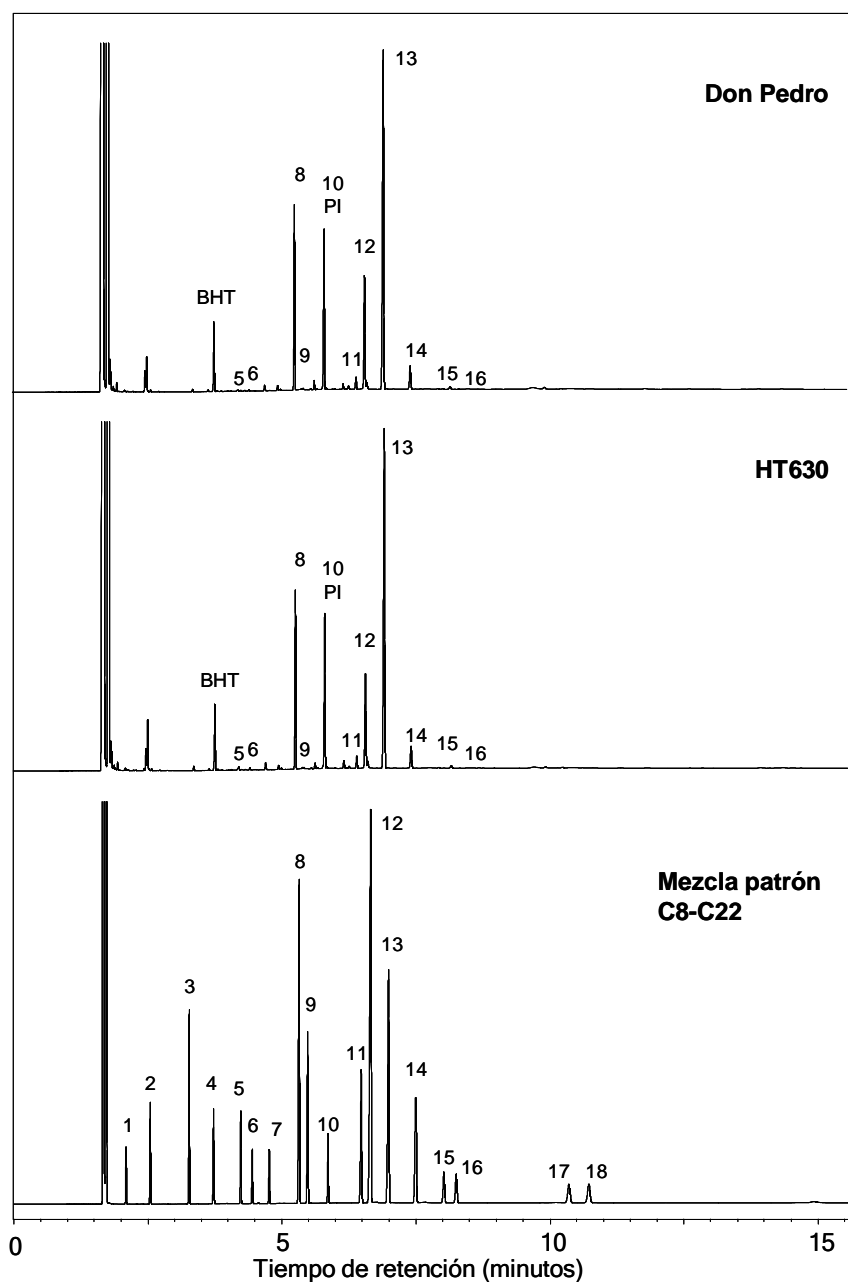


Figura 92. Cromatogramas correspondientes al análisis de ácidos grasos (ésteres metílicos; FAMES) mediante cromatografía de gases en muestras de trigo (variedad Don Pedro), tritordeum (línea HT630) y mezcla patrón C8-C22. Identidad de los picos: 1. Ácido caprílico (C8:0); 2. Ácido caprílico (C10:0); 3. Ácido laúrico (C12:0); 4. Ácido tridecanóico (C13:0); 5. Ácido mirístico (C14:0); 6. Ácido miristoléico (C14:1); 7. Ácido pentadecanóico (C15:0); 8. Ácido palmítico (C16:0); 9. Ácido palmitoléico (C16:1); 10. Ácido heptadecanóico (C17:0), PI: patrón interno; 11. Ácido esteárico (C18:0); 12. Ácido oléico (C18:1); 13. Ácido linoléico (C18:2); 14. Ácido linolénico (C18:3); 15. Ácido araquídico (C20:0); 16. Ácido eicosanóico (C20:1); 17. Ácido behénico (C22:0); 18. Ácido erúico (C22:1).

Tabla 16. Composición de ácidos grasos ($\mu\text{g/g}$)* en granos de trigo duro y tritordeum.

Ácido graso	HT630	HT621	HT609	Don Pedro	Simeto	Claudio
Mirístico (C14:0)	132.84 \pm 4.22 ^a (0.59)	92.64 \pm 5.42 ^b (0.39)	104.17 \pm 3.81 ^c (0.42)	44.05 \pm 3.19 ^d (0.13)	59.95 \pm 3.39 ^e (0.32)	50.41 \pm 1.69 ^d (0.25)
Miristoléico (C14:1)	48.30 \pm 4.24 ^a (0.22)	21.32 \pm 5.14 ^b (0.09)	28.36 \pm 2.49 ^{cd} (0.11)	29.10 \pm 1.48 ^c (0.14)	24.96 \pm 2.91 ^{bdc} (0.13)	35.30 \pm 1.17 ^e (0.17)
Palmitico (C16:0)	4598.40 \pm 161.47 ^a (20.59)	5345.60 \pm 187.32 ^b (22.24)	5706.80 \pm 136.07 ^c (23.1)	4285.58 \pm 86.65 ^d (20.78)	4039.65 \pm 43.06 ^e (21.51)	4058.62 \pm 72.07 ^e (20.02)
Palmitoléico (C16:1)	42.76 \pm 4.83 ^{ad} (0.19)	48.83 \pm 2.29 ^a (0.2)	63.16 \pm 18.40 ^b (0.26)	32.11 \pm 1.32 ^c (0.16)	39.34 \pm 0.90 ^d (0.21)	35.58 \pm 0.69 ^{cd} (0.18)
Esteárico (C18:0)	407.19 \pm 24.95 ^a (1.82)	412.97 \pm 15.18 ^a (1.72)	400.96 \pm 14.12 ^a (1.62)	353.68 \pm 10.45 ^b (1.71)	321.23 \pm 20.75 ^b (1.71)	349.60 \pm 18.54 ^b (1.72)
Oléico (C18:1)	3111.88 \pm 20.85 ^a (13.94)	3455.16 \pm 191.62 ^{bc} (14.37)	3284.07 \pm 195.58 ^{ac} (13.29)	3420.16 \pm 77.38 ^b (16.58)	2595.54 \pm 37.39 ^c (13.82)	3045.54 \pm 57.44 ^a (15.02)
Linoléico (C18:2)	12892.51 \pm 406.35 ^a (57.74)	13687.97 \pm 358.65 ^b (56.96)	14099.86 \pm 317.98 ^b (57.08)	11481.96 \pm 98.76 ^c (55.67)	10756.64 \pm 148.77 ^d (57.27)	11823.92 \pm 133.67 ^c (58.33)
Linolénico (C18:3)	923.80 \pm 49.06 ^a (4.14)	769.12 \pm 14.68 ^b (3.2)	814.87 \pm 13.52 ^{bc} (3.3)	850.23 \pm 19.35 ^c (4.12)	824.43 \pm 31.19 ^c (4.39)	745.15 \pm 8.18 ^b (3.68)
Araquídico (C20:0)	35.74 \pm 1.05 ^{ab} (0.16)	37.27 \pm 2.06 ^a (0.15)	36.82 \pm 1.59 ^a (0.15)	32.97 \pm 0.83 ^b (0.16)	27.59 \pm 2.81 ^c (0.1)	33.14 \pm 0.83 ^b (0.11)
Eicosanóico (C20:1)	133.85 \pm 6.31 ^a (0.6)	162.17 \pm 6.48 ^b (0.67)	165.56 \pm 9.57 ^b (0.67)	111.05 \pm 4.68 ^c (0.54)	101.75 \pm 1.35 ^c (0.54)	105.62 \pm 1.45 ^c (0.52)

* La tabla representa los valores medios y la desviación estándar para tres replicados (n=3). Los datos entre paréntesis se refieren a composición porcentual.

** Para ácido graso, los valores que muestran distinto superíndice presentan diferencias significativas (test Duncan, $p < 0.05$).

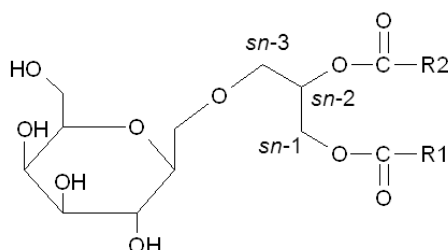


Estos datos sugieren que el proceso enzimático responsable de la formación y acumulación de ésteres de xantofilas en vegetales es altamente selectivo, lo cual se deduce también de los datos encontrados en el presente estudio puesto que no se han detectado xantofilas esterificadas con ácido oleico (C18:1), el cual está presente en una proporción importante (13-16%) dentro de la fracción de lípidos de trigo duro y tritordeum. La inexistencia de ésteres de xantofila en las variedades de trigo duro estudiadas en el presente estudio podría indicar que la capacidad de síntesis de éstos compuestos pudiera haber sido transferida a tritordeum desde el otro parental, la cebada silvestre (*H. chilense*), aspecto que debe ser confirmado experimentalmente. Los resultados obtenidos en el presente estudio están de acuerdo con los encontrados por Kaneko *et al.*, (1995), siendo ambos estudios los únicos que describen en detalle la presencia de ésteres de luteína en cereales.

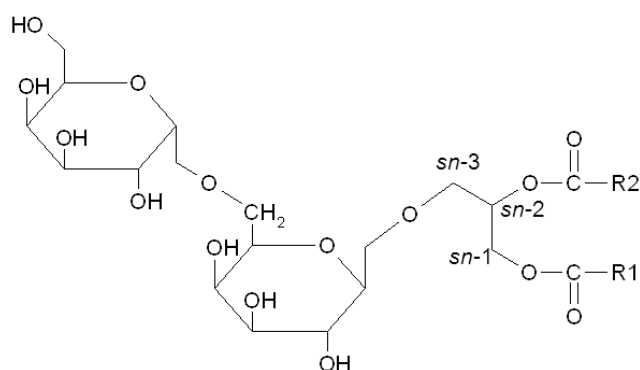
Teniendo en cuenta que la fracción lipídica del endospermo de trigo está formada mayoritariamente por lípidos del tipo monogalactosildiacilglicerol (MGDG) y digalactosildiacilglicerol (DGDG) no sería extraño pensar que estas fuesen las moléculas implicadas en la donación/transferencia de grupos acilo durante la esterificación de xantofilas. Además, dichas moléculas también son las que conforman la fracción lipídica mayoritaria de las membranas tilacoidales de los cloroplastos, cuya desintegración durante la transformación en cromoplastos es coincidente con la síntesis de xantofilas esterificadas que acontece durante la maduración de frutos carotenogénicos y la senescencia de vegetales. Arunga y Morrison (1971) caracterizaron la composición en ácidos grasos de MGDG y DGDG de harina de trigo, concluyendo que los ácidos grasos implicados eran linoleico, palmítico y oleico, diferenciando entre la posición *sn*-2, casi exclusivamente esterificada con ácidos grasos C18 (mayoritariamente linoleico, 83%), y la posición *sn*-1 en las que participa también palmítico en un 11 y 26% para MGDG y DGDG respectivamente. La participación del ácido oleico fue semejante (4-9%) para ambas posiciones (*sn*-1 y *sn*-2), tanto MGDG y DGDG. Esta distribución de ácidos grasos no discrepa mucho de la encontrada en el presente trabajo.

A la vista de estos resultados, tritordeum podría ser considerado como un modelo vegetal ideal para la caracterización molecular y genética del proceso de esterificación de xantofilas por concurso de enzimas aciltransferasas (XAT; xanthophyll acyl transferase), hasta ahora desconocidas, así como para la identificación de las moléculas donadoras de los grupos acilo, tales como los ácidos grasos libres y/o distintos tipos de lípidos acilados (triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, fosfolípidos, galactolípidos, etc). Así, mientras que la mayoría de frutos presentan un perfil de esterificación complejo, involucrando a diez o más carotenoides y al menos cuatro ácidos grasos implicados, en el caso de tritordeum la

situación se minimiza a un solo carotenoide (luteína) y dos ácidos grasos mayoritarios (ácidos palmítico y linoléico). Además la posibilidad en tritordeum de distinguir entre los posibles regioisómeros de los monoésteres y diésteres de luteína incrementa el potencial de este modelo vegetal para generar información que pueda contribuir a descifrar y comprender el proceso natural de esterificación de xantofilas en vegetales.



Monogalactosil diacilglicerol (MGDG)



Digalactosil diacilglicerol (DGDG)

Figura 93. Estructuras de monogalactosil diacilglicerol (MGDG) y digalactosil diacilglicerol (DGDG). R1 y R2 corresponden a ácidos grasos.

5.4. Composición de pigmentos carotenoides en granos de *Hordeum chilense*.

Al objeto de completar la caracterización del perfil de pigmentos carotenoides de los dos parentales de tritordeum, en el presente apartado se planteó el análisis de granos de *Hordeum chilense*, que de forma conjunta con los datos ya obtenidos para trigo duro y tritordeum puede ayudarnos a una mejor y más completa caracterización del proceso carotenogénico en tritordeum. La principal limitación para este estudio radica en la escasa disponibilidad de material vegetal, concretamente granos, con los que poder realizar los análisis. Téngase en cuenta que el peso medio de 50 granos de *H. chilense* ronda los 120 mg. Con este objetivo fueron analizados granos de *H. chilense* procedentes de la National Small Grains Collection del US National Plant Germplasm System (USDA), de los cuales se recibieron 50 semillas correspondientes a tres registros: PI 283377 (C.P.I. 25760), PI 283376 (C.P.I. 25759) y PI 531781 (D-2739), todos procedentes de América del Sur. La limitación de tiempo impidió la siembra y reproducción de las semillas recibidas, por lo que el análisis de pigmentos se realizó directamente sobre el material recibido. Tras la inspección de las tres muestras se determinó que solo los granos correspondientes al registro PI 531781 presentaban síntomas de viabilidad, siendo ésta la única muestra analizada. Por esta razón, el alcance de los resultados obtenidos debe ser considerado como preliminar y prospectivo, siendo necesario ampliar el estudio tanto en número de muestras como en el tamaño de las mismas. En cualquier caso se trata de la primera vez que se caracteriza la composición individual de pigmentos carotenoides en granos de *H. chilense*, y los datos encontrados aportan información interesante que avala, sin género de dudas, la afirmación de que del perfil carotenoide de tritordeum y su mayor capacidad de síntesis deriva en gran medida de este parental. La **Figura 94** muestra fotografías de la planta de *H. chilense*, así como de los granos correspondientes al registro PI 531781 analizado.



Figura 94. Planta de cebada silvestre (*H. chilense*) con espigas maduras (A) y granos (B) del registro PI 531781 (NSGC, USDA).

Como se puede observar en el cromatograma mostrado en la **Figura 95**, el perfil de carotenoides encontrados se asemeja bastante con el correspondiente a tritordeum en términos cualitativos. Hay que mencionar que debido a la limitación de material vegetal disponible, la identificación en *H. chilense* se realizó exclusivamente en base a las propiedades cromatográficas (tiempo de retención; Rt) y espectroscópicas (UV-visible) obtenidas mediante el sistema de HPLC-DAD utilizado para el análisis. En la **Tabla 17** se muestra la composición cuantitativa correspondiente. La primera analogía que se observa es la presencia destacada de ésteres de luteína, coincidiendo la identidad de los mismos con los que se han identificado en tritordeum. Análogamente a lo observado en tritordeum, all-*trans*-luteína en forma libre (no esterificada) resultó ser el pigmento mayoritario, el cual también estuvo acompañado de los isómeros 9-*cis* y 13-*cis*.

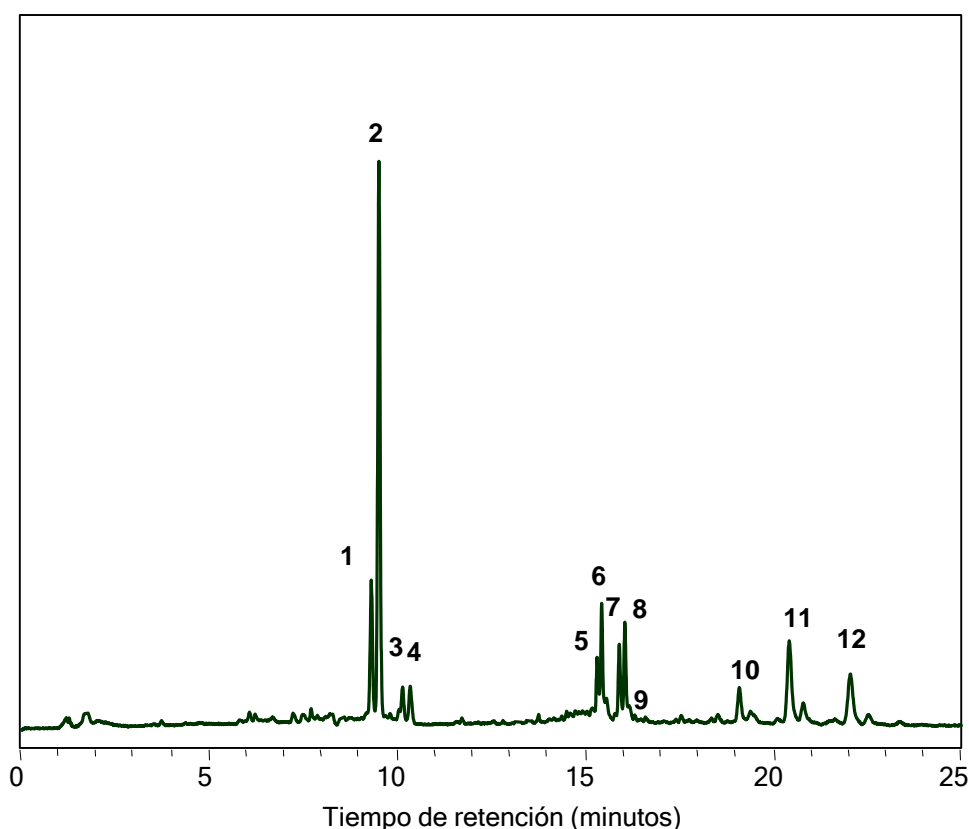


Figura 95. Cromatograma correspondiente a la separación en fase inversa C18 de los pigmentos carotenoides extraídos de granos de *Hordeum chilense* (reg. PI531781). Identidad de los picos: 1. all-*trans*-zeaxanteno; 2. all-*trans*-luteína; 3. 9-*cis*-luteína; 4. 13-*cis*-luteína; 5. all-*trans*-luteína-3'-*O*-linoleato; 6. all-*trans*-luteína-3-*O*-linoleato; 7. all-*trans*-luteína-3'-*O*-palmitato; 8. all-*trans*-luteína-3-*O*-palmitato; 9. β-caroteno; 10. all-*trans*-luteína-3,3'-dilinoato; 11. all-*trans*-luteína-3'-*O*-linoleato-3-*O*-palmitato y all-*trans*-luteína-3'-*O*-palmitato-3-*O*-linoleato; 12. all-*trans*-luteína-3,3'-dipalmitato. Detección a 450 nm. (Para condiciones de reacción y cromatográficas consultar la sección de *Materiales y Métodos*).

Así mismo, destaca la presencia de zeaxanteno (12.1%), también observado en trigo duro pero ausente en los tritordeum analizados hasta el momento. Este aspecto es interesante, puesto que si bien los dos parentales parecen presentar la capacidad de sintetizar zeaxanteno, éste no se observa en el anfiploide tritordeum, lo cual podría deberse a una sobreactivación de la ruta biosintética β,ϵ conducente a luteína en detrimento de la ruta β,β (**Figura 87**) que da lugar a la formación de zeaxanteno. Esta posibilidad parece más probable que la pérdida de capacidad de síntesis de zeaxanteno dado que tritordeum presenta niveles detectables de β -caroteno, su precursor. Llama la atención los reducidos niveles de β -caroteno, y la ausencia de α -caroteno, aunque pudiera haber ocurrido que durante el largo periodo de almacenamiento de estas semillas en el banco de germoplasma los niveles de ambos pigmentos, a menudo minoritarios en otros cereales, hubieran descendido drásticamente debido a su menor estabilidad en comparación con las xantofilas.

En términos cuantitativos, el contenido carotenoides total ($6.140 \pm 0.118 \mu\text{g/g}$) fue muy similar al de tritordeum y superiores a otros cereales como trigo duro (Hentschel *et al.*, 2002; Adon *et al.*, 2003; Fratianni *et al.*, 2005; Abdel-Aal *et al.*, 2007), si bien hay que tener en cuenta que la capacidad de producción de semillas es muy reducida en comparación con los cereales cultivados. Estos datos contrastan con otros análisis anteriores (Álvarez *et al.*, 1999b) en los que se determinó que los granos de *H. chilense* presentan un contenido en pigmentos marcadamente superior a tritordeum, quedando éstos situados en una posición intermedia, salvo excepciones, entre sus progenitores. El contenido total de luteína alcanzó el 87.65% de los carotenoides totales, presentando una destacada proporción de ésteres (55.05%) de los cuales el 25.95% fueron monoésteres y el 29.10% diésteres (**Figura 96**). Los regioisómeros de monoésteres de luteína en posición 3 (luteína-3-*O*-linoleato y luteína-3-*O*-palmitato) fueron encontrados en concentración superior a los monoésteres en posición 3' (luteína-3'-*O*-linoleato y luteína-3'-*O*-palmitato), lo cual concuerda con lo observado para tritordeum. Este hecho apoya nuevamente el carácter preferencial de los hidroxilos de esta posición de la molécula de luteína a ser esterificados por los sistemas enzimáticos implicados (XAT). Sin embargo, el análisis de *H. chilense* presentó cantidades similares para los ésteres con ácido palmítico y linoleico, que impiden deducir una actividad preferente sobre uno u otro ácido graso. No obstante, al analizar la composición de la fracción de diésteres se observó una mayor presencia del homodiestéer con ácido palmítico (luteína dipalmitato) frente al correspondiente con ácido linoleico (luteína dilinoleato) lo cual si permite afirmar que existe una mayor afinidad por la esterificación con ácido palmítico, al igual que lo observado en tritordeum. Recuérdese que el pico cromatográfico denominado luteína linoleatopalmitato, correspondiente a la fracción



de heterodiésteres, está conformado por dos regioisómeros (luteína-3'-*O*-linoleato-3-*O*-palmitato y luteína-3'-*O*-palmitato-3-*O*-linoleato), y de ahí su mayor área en comparación con los otros dos picos de homodiésteres correspondientes a un único compuesto. Al no ser posible la determinación individualizada de cada regioisómero de la forma heterodiéster, no podemos establecer si existen diferencias en la abundancia relativa entre ambas. Podemos concluir, que la distribución de ésteres encontrada apoya la hipótesis de la procedencia de esterificación de luteína en tritordeum como un carácter procedente del fondo genético de *H. chilense*.

Tabla 17. Composición cualitativa y cuantitativa ($\mu\text{g/g}$) de pigmentos carotenoides presentes en granos de *Hordeum chilense* (reg. PI531781)*

Carotenoide	Concentración ($\mu\text{g/g}$ peso fresco)	%
all- <i>trans</i> -Zeaxanteno	0.743 ± 0.012	12.11 ± 0.04
all- <i>trans</i> -Luteína	2.073 ± 0.037	33.76 ± 0.16
9- <i>cis</i> -Luteína	0.171 ± 0.005	2.78 ± 0.10
13- <i>cis</i> -Luteína	0.175 ± 0.016	2.85 ± 0.21
Luteína monolinoleato	0.715 ± 0.009	11.64 ± 0.15
Luteína-3'- <i>O</i> -linoleato	0.227 ± 0.009	3.70 ± 0.13
Luteína-3- <i>O</i> -linoleato	0.488 ± 0.007	7.94 ± 0.16
Luteína monopalmitato	0.682 ± 0.007	11.11 ± 0.16
Luteína-3'- <i>O</i> -palmitato	0.299 ± 0.007	4.86 ± 0.10
Luteína-3- <i>O</i> -palmitato	0.383 ± 0.006	6.24 ± 0.09
Luteína dilinoleato	0.309 ± 0.019	5.02 ± 0.22
Luteína linoleatopalmitato	0.745 ± 0.021	12.13 ± 0.12
Luteína dipalmitato	0.512 ± 0.010	8.34 ± 0.05
α -Caroteno	n.d.**	-
β -Caroteno	0.015 ± 0.001	0.24 ± 0.01
Luteína total	5.382 ± 0.106	87.65 ± 0.05
Monoésteres totales	1.397 ± 0.011	22.75 ± 0.29
Diésteres totales	1.566 ± 0.049	25.51 ± 0.35
Esteres totales	2.963 ± 0.059	48.26 ± 0.24
Carotenoides totales	6.140 ± 0.118	

*La tabla representa los valores medios y la desviación estándar para cuatro replicados ($n=4$).

** n.d. no detectado

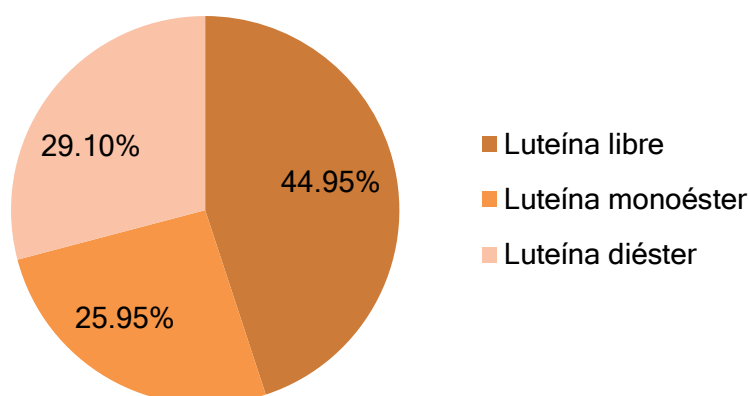


Figura 96. Distribución de las fracciones de luteína libre y esterificada (monoésteres y diésteres) en granos de *H. chilense* (PI 531781). Los datos representan los valores medios para cuatro determinaciones (n=4).

Como ya se ha expuesto en el apartado de *Antecedentes*, *H. chilense* es considerado como el parental de tritordeum responsable de su elevado contenido carotenoides con respecto a trigo duro (Álvarez *et al.*, 1998; Atienza *et al.*, 2004, 2007b,d; Rodríguez-Suárez y Atienza, 2012), apuntando que el origen de este carácter debe de venir derivado y controlado por el genoma de esta cebada silvestre. Los datos aquí presentados, confirman esta afirmación, siendo la primera vez que de forma individualizada se caracteriza el perfil carotenoides de este cereal. No obstante en la interpretación de estos resultados se debe de tener en cuenta que estos granos (variedades registradas) no son estrictamente los parentales utilizados para generar las líneas de tritordeum (Martín y Chapman, 1977; Martín y Sánchez-Monge Laguna, 1980). El uso de parientes y especies silvestres, como fuentes de variabilidad genética y de aporte de caracteres agronómicos favorables a las cultivadas, está constituyendo una de las estrategias más importante en la mejora vegetal. *H. chilense* destaca en este campo como fuente valiosa de genes para incrementar el contenido carotenoides en trigo, siendo tritordeum el vector empleado para la transferencias de los caracteres asociados (Ballesteros *et al.*, 2000; Rodríguez-Suárez *et al.*, 2010). La caracterización detallada de la composición carotenoides de *H. chilense* que se ha presentado en este apartado podrá ser de utilidad para optimizar su uso en el campo de la biofortificación de cereales a través del incremento del contenido carotenoides.



5.5. Localización y distribución de pigmentos carotenoides en granos de trigo duro y tritordeum.

La mayoría de las investigaciones dirigidas al estudio de los pigmentos carotenoides en cereales atribuyen su localización al endospermo, siendo escasas las investigaciones que diferencian entre las distintas partes del grano (Borrelli *et al.*, 2008). Dado que en el presente trabajo de investigación se utilizan siempre granos enteros, así como sus correspondientes harinas (harinas integrales), resulta de especial interés conocer el patrón de distribución de pigmentos carotenoides entre las dos principales partes organográficas del grano, embrión y endospermo (Figura 97A), lo cual pueda permitir establecer diferencias que contribuyan a la comprensión de la carotenogénesis en cereales y su aplicación a la mejora desde un punto de vista nutricional. El estudio se ha realizado en los dos genotipos objeto de estudio, seleccionando (Figura 97B) para ello una variedad representativa de cada tipo de cereal, Simeto (trigo duro) y HT621 (tritordeum), caracterizadas en el apartado anterior. Los granos seleccionados fueron sometidos a un minucioso proceso de disección a fin de separar la fracción de embrión y endospermo.

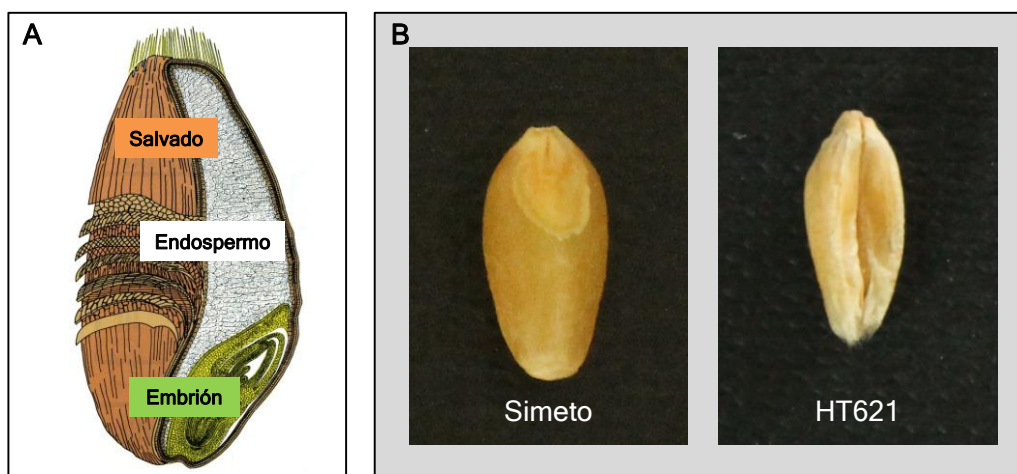


Figura 97. Partes principales del grano de cereal (A) y granos (B) de trigo duro (variedad Simeto) y tritordeum (línea HT621).

En la **Tabla 18** se muestra el peso promedio (mg) de los granos, así como la contribución (%) de la fracción de embriones y endospermo, para los dos cereales estudiados. Como puede observarse, se pone de manifiesto que los granos de tritordeum presentan embriones de tamaño superior con respecto al resto de grano (7.10%) en comparación con trigo duro (2.91%), aunque los granos de éstos últimos son en términos absolutos superiores en peso, duplicando el correspondiente de tritordeum.



Tabla 18. Peso medio de los granos de trigo duro (variedad Simeto) y tritordeum (línea HT621), y distribución porcentual entre embrión y endospermo.

	Trigo duro Simeto	Tritordeum HT621
Peso medio del grano (mg)*	68.1 ± 3.2	34.5 ± 2.6
Embrión (%)	2.91	7.10
Endospermo (%)	97.09	92.90

* Valor promedio y desviación estándar para 100 granos (n=100).

La **Tabla 19** muestra la composición ($\mu\text{g/g}$) en pigmentos carotenoides individuales para las fracciones aisladas de embrión y endospermo en ambos cereales, mostrándose los respectivos cromatogramas de HPLC en la **Figura 98**. Un primer análisis del contenido carotenoide total pone de manifiesto diferencias entre ambos cereales, los cuales están en consonancia con la caracterización realizada previamente, de tal forma que el contenido carotenoide fue marcadamente superior en las dos fracciones (embrión y endospermo) de tritordeum. Llama la atención el elevado contenido carotenoide encontrado en el tejido embrionario de trigo duro ($2.518 \mu\text{g/g}$), triplicando al observado en endospermo ($0.741 \mu\text{g/g}$), lo cual se encuentra en consonancia con otros estudios anteriores (Hentschel *et al.*, 2002; Adom *et al.*, 2005; Konopka *et al.*, 2004; Liu, 2007; Hidalgo y Brandolini, 2008a), al tiempo que avala la conveniencia y recomendación del consumo de cereales integrales desde un punto de vista nutricional. Sin embargo, estos datos contrastan con lo observado en tritordeum, en donde el contenido carotenoide fue análogo en embrión y endospermo (4.162 y $4.589 \mu\text{g/g}$, respectivamente). En términos comparativos, el contenido carotenoide en endospermo de tritordeum fue de unas 6.2 veces superior con respecto a trigo duro, mientras que en el caso de los embriones dicha diferencia fue de tan solo 1.65 veces.

El análisis detallado de ambas fracciones arrojó claras diferencias cualitativas, destacando como principal singularidad la presencia de ésteres de luteína en ambas fracciones de tritordeum. Así la fracción de embrión presentó los carotenoides típicamente cloroplásticos, tales como luteína, violaxanteno, neoxanteno y β -caroteno, evidenciando la operatividad de la ruta carotenogénica característica de tejidos fotosintéticos (**Figura 36**), y que caracteriza a los embriones de las semillas vegetales como estadio previo a un órgano vegetal fotosintéticamente activo (hojas principalmente). A nivel cuantitativo, el perfil carotenoide también guardó cierta similitud con el encontrado en vegetales verdes, siendo luteína el pigmento mayoritario en ambos cereales (47 y 80% para trigo duro y tritordeum, respectivamente), seguida de zeaxanteno (31 y 11%, respectivamente), violaxanteno (8 y



2%), neoxanteno (7 y 5%) y β -caroteno (5 y 2%). β -Criptoxanteno, anteraxanteno y α -caroteno fueron también detectados, pero a niveles muy reducidos. Este último, solo fue detectado a nivel de trazas en el endospermo de trigo duro. Cabe destacar el mayor nivel de β -caroteno observado para embriones de trigo duro (0.126 $\mu\text{g/g}$), siendo casi 20 veces superior al contenido en endospermo, por lo que la contribución al contenido en provitamina A por parte del embrión es significativamente importante. De nuevo esta diferencia no fue tan marcada en tritordeum, con un contenido de β -caroteno (0.066 $\mu\text{g/g}$) en embrión cercano a la mitad del encontrado en trigo duro, pero superior al observado en endospermo (0.023 $\mu\text{g/g}$) de tritordeum. De manera análoga, cabe subrayar lo observado para zeaxanteno, destacando su elevado contenido en el tejido embrionario de trigo duro (0.788 $\mu\text{g/g}$), superando en unas 11 veces al contenido encontrado en el endospermo, lo cual indica que el zeaxanteno encontrado en granos de trigo duro, y que caracteriza a este cereal, proceden en una proporción importante del embrión. En concordancia con la caracterización realizada en tritordeum, no se detectó zeaxanteno en tejido endospermico correspondiente, mientras que si fue encontrado en los correspondientes embriones, en consonancia con lo anteriormente observado en trigo duro. No obstante, la baja contribución del embrión en relación al grano completo pudiera explicar la no detección de zeaxanteno en los análisis de grano completo de tritordeum. Los datos obtenidos para luteína muestran, en comparación con zeaxanteno, una distribución más uniforme en los granos de trigo duro y tritordeum, lo cual ya ha sido apuntado previamente por otros autores (Pinzino *et al.*, 1999; Adom *et al.*, 2005). Esta diferencia de distribución para zeaxanteno, podría derivar de la operatividad del ciclo del violaxanteno, y del hecho de que zeaxanteno es precursor directo de otros carotenoides involucrados en la síntesis de ácido abscísico (ABA), como son neoxanteno y violaxanteno (Seo y Koshiba, 2002). ABA es una fitohormona vegetal muy importante, estando involucrada en mecanismos relacionados como la dormancia del embrión, el desarrollo de semillas y la respuestas a situaciones de estrés, acumulándose de manera significativa en el tejido embrionario de los granos de cereal (King, 1979; Jones y Brenner, 1987; Jacobsen *et al.*, 2002).

Por lo que respecta a los ésteres, se confirmó la presencia de éstos tanto en el embrión como en el endospermo de tritordeum, no presentando diferencias cualitativas en cuanto a la naturaleza de la esterificación entre ambos tipos de tejidos, estando en consonancia con lo anteriormente expuesto en el apartado de caracterización (apartado 5.1). A nivel cuantitativo, el endospermo de tritordeum presentó un contenido en ésteres de luteína (1.922 $\mu\text{g/g}$) unas 3.5 veces superior al de embrión, sugiriendo que la síntesis y acumulación de los mismos tiene lugar de manera preferente en el tejido de reserva. Este hecho se pone especialmente de manifiesto en la **Tabla 20**, en la cual se muestra la



composición relativa (%) de luteína libre, monoesterificada y diesterificada presente en el embrión y endospermo de tritordeum, destacando este último con un 42.10% de luteína esterificada (31.11% monoésteres y 10.99% diésteres) frente al 19.08% en el embrión (15.36 % monoésteres y 3.71% diésteres).

Tabla 19. Composición cualitativa y cuantitativa ($\mu\text{g/g}$) de pigmentos carotenoides presentes en las fracciones de embrión y endospermo de granos de trigo duro (Simeto) y tritordeum (HT621).

Pigmento	Trigo duro		Tritordeum	
	Embrión	Endospermo	Embrión	Endospermo
Neoxanteno	$0.170 \pm 0.009^*$	n.d.**	0.202 ± 0.006	n.d.
Violaxanteno	0.196 ± 0.003	n.d.	0.066 ± 0.004	n.d.
Anteraxanteno	0.023 ± 0.001	n.d.	0.039 ± 0.009	n.d.
α + β -Criptoxanteno	0.037 ± 0.002	n.d.	n.d.	n.d.
all- <i>trans</i> -Zeaxanteno	0.788 ± 0.032^a	0.074 ± 0.001^b	0.448 ± 0.002	n.d.
all- <i>trans</i> -Luteína	0.867 ± 0.038^a	0.509 ± 0.017^b	2.231 ± 0.043^a	2.302 ± 0.044^a
9- <i>cis</i> -Luteína	0.124 ± 0.010^a	0.065 ± 0.001^b	0.219 ± 0.004^a	0.199 ± 0.002^b
13- <i>cis</i> -Luteína	0.187 ± 0.008^a	0.082 ± 0.002^b	0.253 ± 0.007^a	0.143 ± 0.002^b
Luteína monolinoleato	-	-	0.199 ± 0.002^a	0.556 ± 0.005^b
Luteína-3'- <i>O</i> -linoleato	-	-	0.044 ± 0.002^a	0.100 ± 0.002^b
Luteína-3- <i>O</i> -linoleato	-	-	0.155 ± 0.002^a	0.456 ± 0.004^b
Luteína monopalmitato	-	-	0.314 ± 0.003^a	0.865 ± 0.018^b
Luteína-3'- <i>O</i> -palmitato	-	-	0.117 ± 0.001^a	0.278 ± 0.007^b
Luteína-3- <i>O</i> -palmitato	-	-	0.197 ± 0.002^a	0.586 ± 0.011^b
Luteína dilinoleato	-	-	0.018 ± 0.001^a	0.057 ± 0.001^b
Luteína linoleatopalmitato	-	-	0.054 ± 0.002^a	0.232 ± 0.002^b
Luteína dipalmitato	-	-	0.052 ± 0.001^a	0.213 ± 0.004^b
α -Caroteno	n.d.	0.004 ± 0.000	n.d.	n.d.
β -Caroteno	0.126 ± 0.004^a	0.007 ± 0.000^b	0.066 ± 0.002^a	0.023 ± 0.002^b
Luteína total	1.179 ± 0.056^a	0.657 ± 0.018^b	3.340 ± 0.049^a	4.566 ± 0.069^b
Monoésteres totales	-	-	0.513 ± 0.004^a	1.421 ± 0.023^b
Diésteres totales	-	-	0.124 ± 0.001^a	0.502 ± 0.007^b
Esteres totales	-	-	0.637 ± 0.003^a	1.922 ± 0.028^b
Carotenoides totales	2.518 ± 0.094^a	0.741 ± 0.019^b	4.162 ± 0.043^a	4.589 ± 0.070^b

*Valor medio y desviación estándar para cuatro replicados ($n=4$). Para cada pigmento, y con respecto a cada tipo de muestra (trigo duro o tritordeum), los valores que muestran distinto superíndice presentan diferencias significativas (test Duncan, $p<0.05$).

**n.d. no detectado.

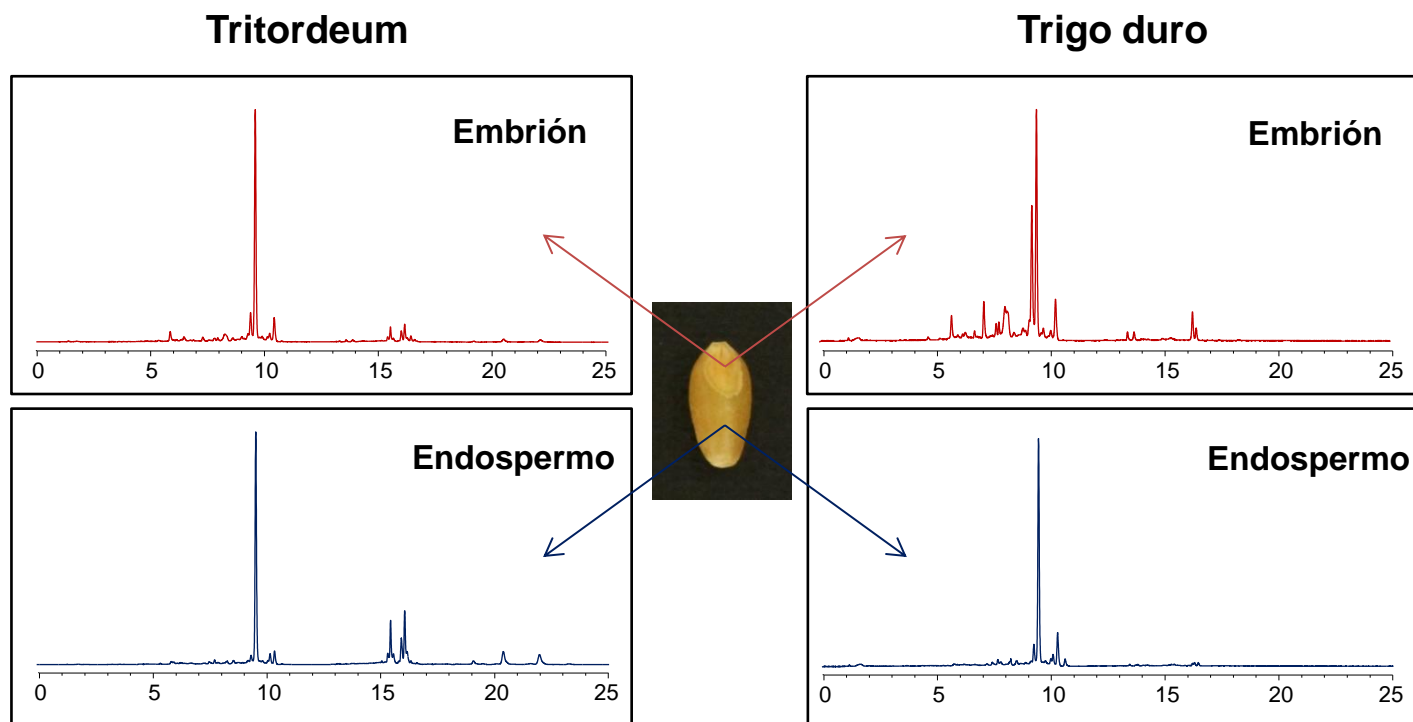


Figura 98. Cromatogramas de HPLC correspondiente a extractos de pigmentos carotenoides obtenidos de las fracciones de embrión y endospermo aisladas de granos de trigo duro (variedad Simeto) y tritordeum (línea HT621). Detección a 450 nm.



Tabla 20. Composición relativa (%) entre las formas libres y esterificadas de luteína presentes en el embrión y endospermo de granos de tritordeum (HT621).

	Luteína libre	Luteína monoéster	Luteína diéster	Esteres totales
Embrión	80.92 ± 1.41*	15.36 ± 0.11	3.71 ± 0.04	19.08 ± 0.10
Endospermo	57.90 ± 1.02	31.11 ± 0.51	10.99 ± 0.15	42.10 ± 0.61

*La tabla representa los valores medios y la error estándar para cuatro replicados (n=4).

Estos datos vienen a apoyar la posible participación, ya apuntada, de monogalactosildiacilglicerol (MGDG) y digalactosildiacilglicerol (DGDG) en la donación/transferencia de los grupos acilos durante la esterificación de las xantofilas, al ser éstos lípidos los más abundantes en el endospermo de cereales (Arunga y Morrison, 1971). Los valores superiores para la relación entre monoésteres y diésteres encontrada en el embrión (4.1) con respecto al endospermo (2.8) revela una mayor actividad esterificante en el tejido endospermico, como se deduce también de su mayor contenido en ésteres totales. Además estos datos demuestran que la presencia de ésteres en el embrión no puede derivar de una contaminación de material endospermico durante el aislamiento de las fracciones, puesto que en dicho caso debería mantenerse una relación similar entre las formas mono- y diesterificadas de luteína para ambas partes del grano. Los contenidos en monoésteres de luteína con ácido palmítico (luteína monopalmitato) fueron los mayoritarios con respecto a los monoésteres con ácido linoléico (luteína monolinoleato) en ambos tejidos, alcanzando su relación valores en torno a 1.55. Estos datos están de acuerdo con una mayor afinidad de las enzimas esterificantes (XAT) por ácido palmítico, lo cual se confirma con el hecho de que el diéster mayoritario fue luteína dipalmitato. Cabe mencionar que aunque cuantitativamente luteína dipalmitato y luteína linoleatopalmitato presentaron aparentemente niveles de concentración similares, éste último se corresponde con la suma de dos regioisómeros (luteína-3'-*O*-linoleato-3-*O*-palmitato y luteína-3'-*O*-palmitato-3-*O*-linoleato), al tratarse de un heterodiestéer, cuyas proporciones relativas pueden variar entre 2 y 3 (ver apartado de *Caracterización*). Así mismo, y con independencia del tipo de tejido analizado y del ácido graso involucrado, se confirmó que el hidroxilo en posición 3 se esterificó preferentemente. Tal y como se observa en la **Figura 99**, la relación entre los monoésteres en posición 3 con respecto a la posición 3' en el embrión de tritordeum alcanzó valores de 3.5 y 1.6 para luteína monolinoleato y luteína monopalmitato, respectivamente. En el caso del endospermo los valores observados fueron superiores (4.6

y 2.1, respectivamente), lo cual pudiera estar también relacionado con la mayor actividad esterificante en endospermo que anteriormente se ha apuntado.

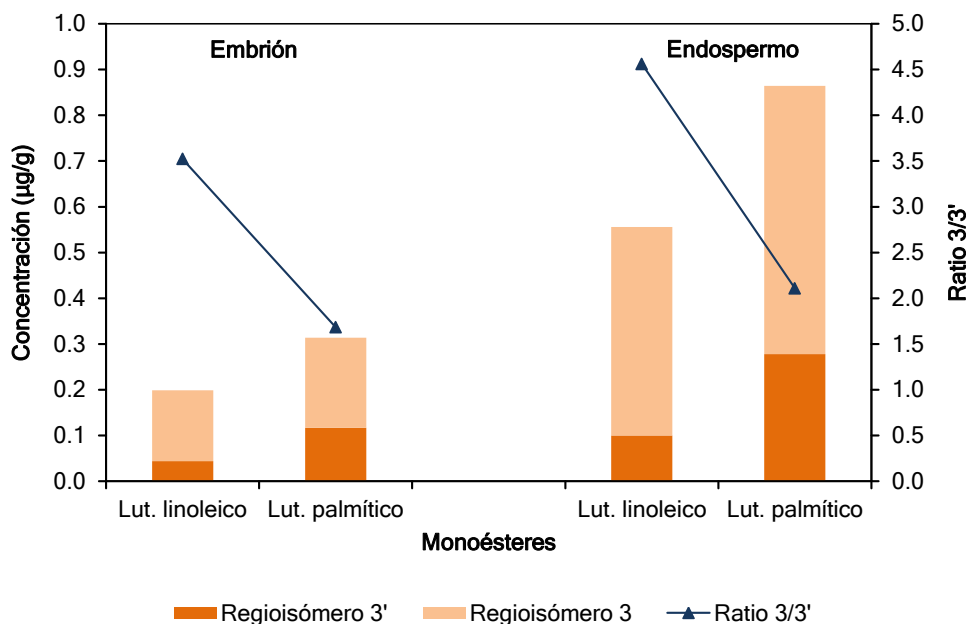


Figura 99. Contenido y relación de monoésteres de luteína y sus regioisómeros presentes en el embrión y endospermo de tritordeum (línea HT621).

Al objeto de determinar si el pool de ácidos grasos disponibles en cada especie de cereal y tipo de tejido pudiera ser determinante de la presencia de ésteres de luteína, se analizó la composición relativa de ácidos grasos en los embriones y endospermos de trigo duro y tritordeum. Como se observa en la **Figura 100**, el perfil cualitativo de ácidos grasos no varió con respecto al tipo de tejido ni especie de cereal. En términos cuantitativos, la composición fue prácticamente idéntica al comparar los endospermos o embriones para ambos tipos de cereales. En todos los casos el ácido graso mayoritario fue linoléico, alcanzando valores ligeramente superiores en el endospermo (59%) con respecto al embrión (55-57%). La principal diferencia entre endospermo y embrión consistió en una mayor proporción de ácido palmítico (25-26%) en el endospermo, que a su vez estuvo acompañada de un contenido más reducido de ácido oleico (9%) con respecto al embrión, donde alcanzó valores de 16-20%. Los datos encontrados están en concordancia con análisis similares realizados en aceite de germen de trigo (Panfili *et al.*, 2003) y en harina de trigo (Arunga y Morrison, 1971; Morrison, 1978). Al no encontrarse diferencias asociadas con la especie, trigo duro y tritordeum, y por lo tanto con la presencia exclusiva de ésteres de luteína, podemos reafirmar que el factor limitante para la síntesis de éstos debe venir determinada por la presencia de enzimas específicas, anteriormente referidas como

xantofila aciltransferasas (XAT). Como ya se ha comentado con anterioridad, el perfil de ácidos grasos del endospermo se correlaciona bastante con el descrito para la fracción de mono y digalactosil diacilglicerol (MGDG y DGDG), mientras que la composición encontrada en embrión podría obedecer al conjunto de triglicéridos y diglicéridos presentes de forma mayoritaria en el embrión (Aruna y Morrison, 1971; Morrison, 1978).

Finalmente, la **Tabla 21** muestra una reconstrucción de la composición carotenoide de los granos de tritordeum y trigo duro teniendo en cuenta la contribución real de cada fracción para cada tipo de cereal. Como puede observarse se obtienen perfiles de composición similares a los análisis obtenidos en el caso de granos completos.

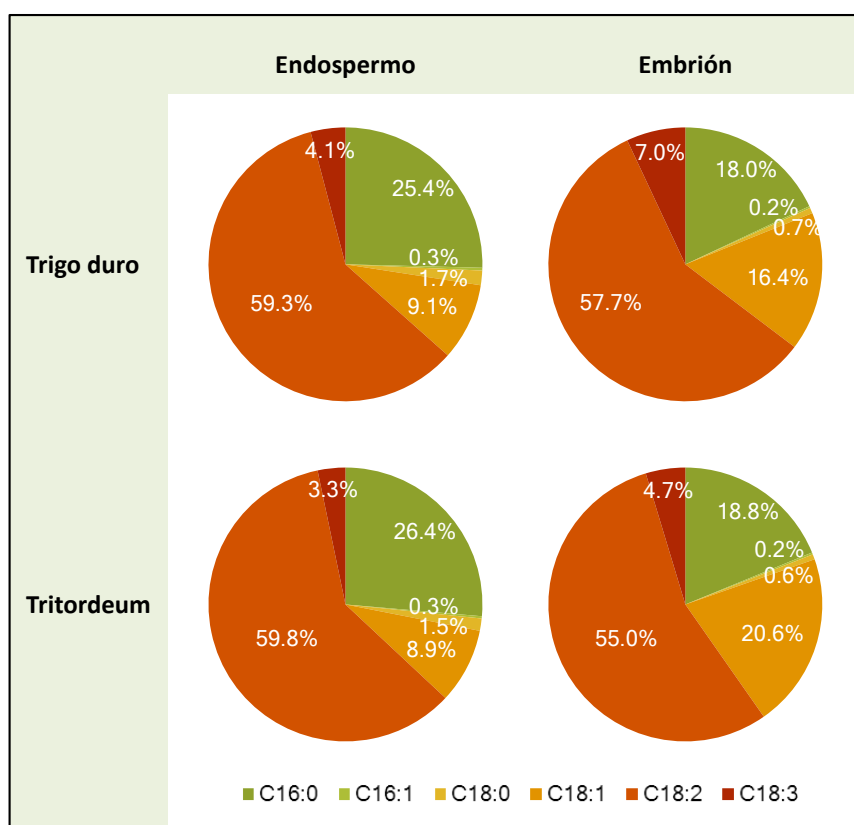


Figura 100. Composición de ácidos grasos en las fracciones de endospermo y embrión de trigo duro (variedad Simeto) y tritordeum (línea HT621). Los datos representan los valores medios para cuatro determinaciones (n=4).

Tabla 21. Contribución cuantitativa ($\mu\text{g/g}$) de las fracciones aisladas de endospermo y embrión al perfil de pigmentos carotenoides de granos de trigo duro (Simeto) y tritordeum (HT621).

Pigmento	Trigo duro (Simeto)			Tritordeum (HT621)		
	Embrión	Endospermo	Grano completo	Embrión	Endospermo	Grano completo
Neoxanteno	$0.005 \pm 0.000^*$	n.d.**	0.005 ± 0.000	0.014 ± 0.000	n.d.	0.014 ± 0.000
Violaxanteno	0.006 ± 0.000	n.d.	0.006 ± 0.000	0.005 ± 0.000	n.d.	0.005 ± 0.000
Anteraxanteno	0.001 ± 0.000	n.d.	0.001 ± 0.000	0.003 ± 0.001	n.d.	0.003 ± 0.001
$\alpha+\beta$ -Criptoxanteno	0.001 ± 0.000	n.d.	0.001 ± 0.000	n.d.	n.d.	n.d.
all- <i>trans</i> -Zeaxanteno	0.023 ± 0.001	0.072 ± 0.001	0.094 ± 0.001	0.032 ± 0.000	n.d.	n.d.
all- <i>trans</i> -Luteína	0.025 ± 0.001	0.495 ± 0.016	0.520 ± 0.017	0.158 ± 0.003	2.139 ± 0.041	2.297 ± 0.043
9- <i>cis</i> -Luteína	0.004 ± 0.000	0.063 ± 0.001	0.067 ± 0.001	0.016 ± 0.000	0.185 ± 0.002	0.200 ± 0.002
13- <i>cis</i> -Luteína	0.005 ± 0.000	0.080 ± 0.002	0.085 ± 0.002	0.018 ± 0.000	0.133 ± 0.002	0.151 ± 0.002
Luteína monolinoleato	-	-	-	0.014 ± 0.000	0.516 ± 0.005	0.530 ± 0.005
Luteína-3'- <i>O</i> -linoleato	-	-	-	0.003 ± 0.000	0.093 ± 0.002	0.096 ± 0.002
Luteína-3- <i>O</i> -linoleato	-	-	-	0.011 ± 0.000	0.423 ± 0.003	0.434 ± 0.003
Luteína monopalmitato	-	-	-	0.022 ± 0.000	0.804 ± 0.017	0.826 ± 0.017
Luteína-3'- <i>O</i> -palmitato	-	-	-	0.008 ± 0.000	0.259 ± 0.006	0.267 ± 0.006
Luteína-3- <i>O</i> -palmitato	-	-	-	0.014 ± 0.000	0.545 ± 0.010	0.559 ± 0.010
Luteína dilinoleato	-	-	-	0.001 ± 0.000	0.053 ± 0.001	0.054 ± 0.001
Luteína linoleatopalmitato	-	-	-	0.004 ± 0.000	0.216 ± 0.002	0.219 ± 0.002
Luteína dipalmitato	-	-	-	0.004 ± 0.000	0.198 ± 0.004	0.201 ± 0.004
α -Caroteno	n.d.	0.004 ± 0.000	0.004 ± 0.000	n.d.	n.d.	n.d.
β -Caroteno	0.004 ± 0.000	0.007 ± 0.000	0.010 ± 0.000	0.005 ± 0.000	0.022 ± 0.001	0.026 ± 0.002
Luteína total	0.034 ± 0.002	0.638 ± 0.018	0.672 ± 0.019	0.237 ± 0.003	4.242 ± 0.064	4.479 ± 0.066
Monoesteres totales	-	-	-	0.036 ± 0.000	1.320 ± 0.022	1.356 ± 0.022
Diesteres totales	-	-	-	0.009 ± 0.000	0.466 ± 0.006	0.475 ± 0.006
Esteres totales	-	-	-	0.045 ± 0.000	1.786 ± 0.026	1.831 ± 0.027
Carotenoides totales	0.073 ± 0.003	0.720 ± 0.018	0.793 ± 0.021	0.295 ± 0.003	4.264 ± 0.065	4.559 ± 0.067

*Valor medio y desviación estándar para cuatro replicados ($n=4$).

**n.d. no detectado.



5.6. Evolución del perfil de pigmentos cloroplásticos durante el desarrollo y la maduración del grano en trigo duro y tritordeum. Análisis de expresión de genes carotenogénicos.

Con el objetivo de avanzar en el conocimiento de la síntesis y acumulación de los carotenoides en cereales se analizó la evolución del perfil de pigmentos en distintos estadios de desarrollo del grano, así como su relación con la composición carotenóide finalmente alcanzada en el estado de total madurez (estadio final, EF). La mayoría de los avances obtenidos sobre carotenogénesis en cereales se han derivado de estudios desarrollados con maíz, debido fundamentalmente a que éste es considerado el cereal con mayores niveles de carotenoides (Wurtzel, 2004; Vallabhaneni y Wurtzel, 2009), y a que la obtención de mutantes es bastante más fácil que en otros cereales (Maluf *et al.*, 1997; Janick-Buckner *et al.*, 1999). En el caso del trigo, y en particular del trigo harinero, el menor contenido que estos presentan de pigmentos carotenoides, unido al carácter hexaploide y la presencia de tres genomas distintos (A, B y D), ha limitado el avance en este campo, siendo más escasos los estudios realizados al respecto. El mayor contenido en pigmentos carotenoides que caracteriza a tritordeum, y las consecuentes aplicaciones nutricionales y tecnológicas que de ello se derivan, hacen especialmente interesante la caracterización del proceso de formación de pigmentos en este cereal y su comparación con especies emparentadas como el trigo duro. El estudio se ha complementado con la cuantificación de los niveles de expresión de genes carotenogénicos, alguno de los cuales codifican para enzimas importantes en el control y regulación de la ruta (como *Psy*), a fin de poder establecer asociaciones entre los transcritos en las etapas de desarrollo y la subsecuente acumulación de carotenoides observada. A diferencia de otros vegetales, como por ejemplo patata, tomate o coliflor (Lieberman *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2006), los mecanismos de control de la biosíntesis de carotenoides en cereales parecen recaer más bien a nivel de los propios genes implicados en la ruta más que sobre otros genes o elementos reguladores externos. Estudios reciente han indicado la existencia en trigo de una buena correlación entre la variabilidad alélica (a nivel genético) observada y la fenotípica con respecto al contenido en pigmentos carotenoides (Zhang y Dubcovsky, 2008). El presente estudio pretende establecer las diferencias genéticas entre trigo duro y tritordeum que justifique las variaciones en los contenidos medios de pigmentos carotenoides que presentan ambas especies.

5.6.1. Cambios en la composición de pigmentos cloroplásticos durante el desarrollo y maduración del grano de cereal.

5.6.1.1. Desarrollo y maduración del grano de trigo duro y tritordeum.

La caracterización del desarrollo y maduración de los granos de cereal ha sido ampliamente descrita a nivel organográfico y citológico (revisado recientemente por Bechtel *et al.*, 2009). Dichos estudios hacen uso de escalas que definen los distintos estadios de crecimiento del grano, y en general de la planta de cereal, siendo los sistemas más conocidos los denominados como escala *Zadoks* o sistema de estadios de crecimiento *Zadoks* (Zadoks *et al.*, 1974) y la escala de Feekes (Large, 1954). La escala *Zadoks*, es la de uso más extendido, y se caracteriza por asignar un código de dos dígitos a cada estado de desarrollo, donde el primer dígito denota los estadios de desarrollo principales (numeración del 0-9) que se comprenden desde la germinación del grano hasta la maduración del mismo pasando por estadios tales como la elongación del tallo o la floración. El segundo dígito, con valores de 0-9, designa los estadios de crecimiento secundarios los cuales subdividen y detallan los fenómenos que acontecen bajo los distintos estadios de crecimiento principales definidos por el primer dígito.

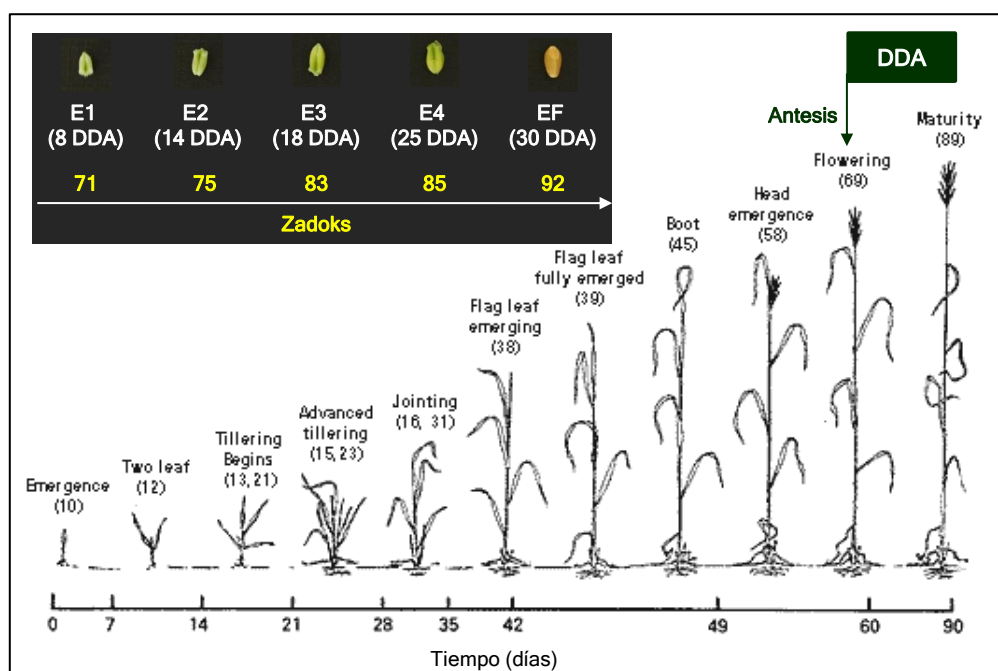


Figura 101. Esquema cronológico del crecimiento de la planta de cereal, indicando el código Zadoks correspondiente. Las fotografías muestran los estadios de desarrollo de los granos seleccionados para el presente estudio. E1 (8 DDA; water ripe, estadio Zadoks 71), E2 (14 DDA; medium milk, estadio Zadoks 75); E3 (18 DDA; early dough, estadio Zadoks 83), E4 (25 DDA; soft dough, estadio Zadoks 85), EF (30 DDA; maduro/harvest ripe, estadio Zadoks 92). Adaptado de Growth and development guide for spring wheat, University of Minnesota (<http://www.extension.umn.edu/distribution/cropsystems/dc2547.html>).

La **Figura 101** describe el desarrollo completo de la planta del trigo, junto con los principales estadios de desarrollo del grano, indicando el código *Zadoks* para cada fase o estadio de crecimiento. El desarrollo del grano se prolonga por un periodo de aproximadamente cuatro semanas, distinguiéndose tres etapas. La **1ª Etapa** (*Etapa de crecimiento*), transcurre desde el momento posterior a la antesis hasta 10 días después de la antesis (DDA), caracterizándose por un crecimiento rápido del grano. Dentro de ésta etapa, existe un periodo comprendido desde el día 4 al 10, en el cual el grano es descrito como “water-ripe” o “pre-milk” (estadio 71 de la escala *Zadoks*) debido al elevado grado de turgencia del mismo. En nuestro caso, el Estadio 1 (**E1**, 8 DDA) analizado pertenece por tanto a esta etapa (**Figura 101**). La **2ª Etapa** (*Etapa de llenado o filling*) del grano se desarrolla en el periodo comprendido entre los 11 y 30 DDA. Esta etapa se caracteriza por una acumulación de proteínas y almidón observándose el incremento en peso seco casi de una manera lineal y el descenso en el porcentaje de humedad. Esta etapa a su vez puede ser dividida en tres, una primera fase, desde 11 a 16 DDA, denominada como “Medium Milk” (Escala *Zadoks* 75) a la cual pertenece el estadio 2 (**E2**, 14 DDA) analizado; Una segunda etapa descrita como “Soft Dough” que abarca desde 17 a 21 DDA (Escala *Zadoks* 85) y una tercera etapa que comprende desde 21 hasta 30 DDA descrita como “Hard Dough” (Escala *Zadoks* 87) en donde el grano alcanza la madurez fisiológica. Dicha etapa se caracteriza porque culmina con la pérdida del color verde y el cese de la acumulación de proteínas y almidón, que llega a su máximo, en el endospermo el cual se prepara para la apoptosis e inicio del proceso de secado del grano. Es importante matizar que los estadios 3 y 4 (**E3** y **E4**), analizados en el presente estudio, aunque pertenezcan debido a su cronología en días (para el primero 18 DDA y para el segundo 25 DDA) a las etapas “Soft Dough” y “Hard Dough”, presentan un aspecto fisiológico que se aproximan más bien a etapas más prematuras denominadas “Early Dough” (Escala *Zadoks* 83) y “Soft Dough” (Escala *Zadoks* 85), respectivamente (**Figura 101**). Finalmente, la última etapa (**3ª etapa**), denominada de secado o maduración (drying down), transcurre desde los 30 a los 40 DDA, periodo durante el cual los granos pierden agua a una velocidad constante quedándose aproximadamente con un contenido del 10-15% de humedad. A esta etapa podemos asociar el estadio denominado en nuestro estudio como Estadio Final (**EF**) (Escala *Zadoks* 92), en la cual el grano se considera con la madurez necesaria para ser cosechado.

Al objeto de realizar el seguimiento individualizado y comparado de la composición en pigmentos cloroplásticos (clorofilas y carotenoides) durante el desarrollo de los granos de trigo duro y tritordeum se seleccionaron cinco variedades de cada genotipo (Trigo duro: Simeto, Claudio, Don Pedro, Kofa y UC1113; Tritordeum: HT240, HT335, HT609, HT621 y HT630). Esto permitió reducir la influencia del genotipo en las variaciones de pigmentos no

asociadas con cada especie. Las plantas fueron cultivadas en campo con un diseño de dos bloques al azar por variedad, al objeto de minimizar el efecto del ambiente sobre el contenido en pigmentos. En la **Figura 102** se pueden observar los estados de desarrollo y madurez analizados en cada uno de los cereales estudiados.

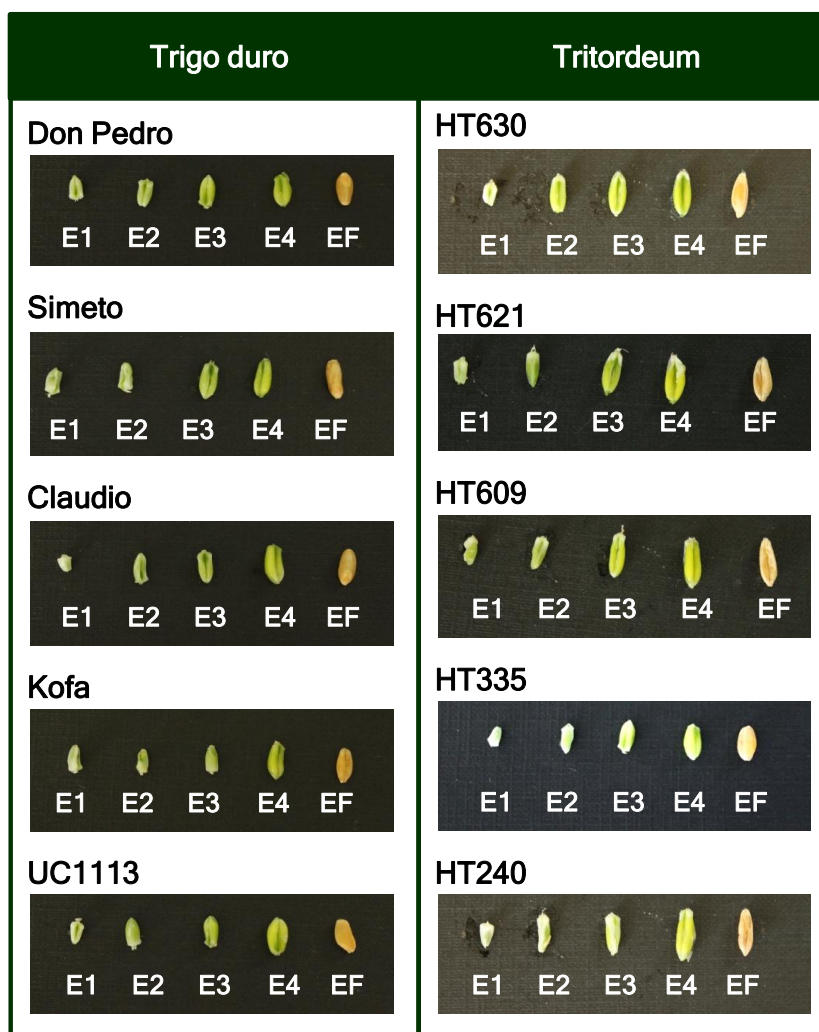


Figura 102. Imágenes de los estados de desarrollo de granos de trigo duro y tritordeum analizados en el presente estudio. E1 (8 DDA), E2 (14 DDA), E3 (18 DDA), E4 (25 DDA) y EF (maduro, harvest).

La **Figura 103** muestra la evolución del peso promedio (mg) y humedad (%) de los granos de cereales de ambas especies en función del estadio de desarrollo. Tanto el peso como la humedad fueron similares en los dos cereales al inicio del desarrollo (**E1**), mostrando diferencias significativas ($p < 0.05$) conforme progresó el mismo. En todo momento el peso de los granos de trigo duro presentó valores superiores a tritordeum. Dado que éstos últimos presentan mayores contenidos de pigmentos en el estadio maduro (**EF**), esta observación está en consonancia con la relación inversa indicada por algunos



autores entre el peso final del grano maduro de cereal y el contenido en pigmentos asociado a un aumento en el almidón del grano durante la etapa de llenado, que consecuentemente se traduce en un efecto de dilución del contenido en pigmentos y otros componentes (Clarke *et al.*, 2006; Digesù *et al.*, 2009; Beleggia *et al.*, 2011). Además, como ya se mostró anteriormente, la contribución de la fracción de endospermo al peso total del grano de cereal es superior en trigo duro cuando se compara con tritordeum.

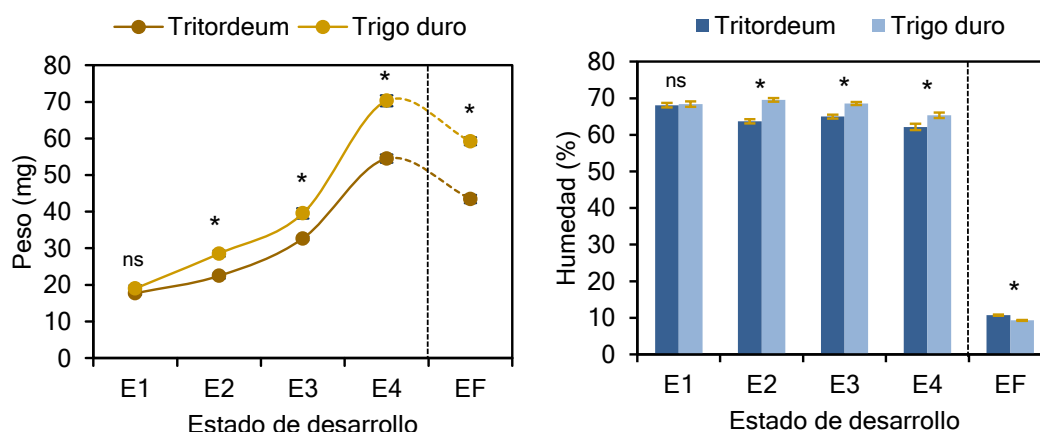


Figura 103. Evolución del peso (mg) y contenido en humedad (%) de los granos de trigo duro y tritordeum durante el desarrollo y maduración. Los valores mostrados representan la media y el error estándar para cada estadio (peso: $n=30$; humedad: $n=20$) en el conjunto de cada genotipo estudiado, trigo duro (Don Pedro, Kofa, Claudio, Simeto y UC1113) y tritordeum (HT240, HT335, HT609, HT630 y HT621). El peso medio del grano en el estado final (EF) se determinó como peso medio de 50 granos por variedad. Los valores marcados con un asterisco muestran diferencias significativas para un mismo estadio de desarrollo (test de Duncan, $p<0.05$). ns: diferencias no significativas.

La **Figura 104** describe la evolución del peso del grano y contenido en humedad conforme progresó el desarrollo de cada una de las variedades analizadas. Las **Tablas A1** y **A2** del *Anexo* resumen el progreso de ambas variables durante el desarrollo, e incluye el análisis de significación estadística (test Duncan, $p<0.05$) para cada estadio con respecto a cada genotipo (trigo duro y tritordeum, respectivamente). Como se observa ambos cereales siguieron pautas de desarrollo y crecimiento en consonancia con los estadios anteriormente descritos. Observaciones similares han sido descritas para maíz (Xu *et al.*, 2010; Hu y Xu, 2011). Los valores de humedad observados se situaron en un rango del 60-70% mostrando una tendencia al descenso conforme avanzó el desarrollo, alcanzando niveles seis veces inferiores en el grano maduro (10.7 y 9.3% como valor medio para tritordeum y trigo duro, respectivamente; **Figura 103**). El incremento de peso fue más acusado en el tránsito del estadio **E3** (18 DDA) al **E4** (25 DDA), lo cual se correspondió claramente con la *etapa de*



llenado caracterizada por la síntesis masiva de hidratos de carbono. Para el conjunto de muestras de tritordeum se observó un aumento continuado de los valores de peso de grano desde el inicio del desarrollo (**E1**, 8 DDA) hasta el final del mismo (**E4**, 25 DDA), incrementando unas 3 veces, mientras que en las variedades de trigo duro este aumento no fue tan homogéneo, mostrando un patrón de evolución más irregular. No obstante, el aumento promedio en peso de los granos de trigo duro durante el desarrollo fue de 3.7 veces. En el paso a estadio **EF**, desde el estadio de desarrollo **E4**, se observó una reducción en los valores de peso y humedad de los granos, que al ser más acusada en este último caso, podría indicar que el proceso de llenado de los granos se extienda y continúe en cierto grado durante la etapa de maduración.

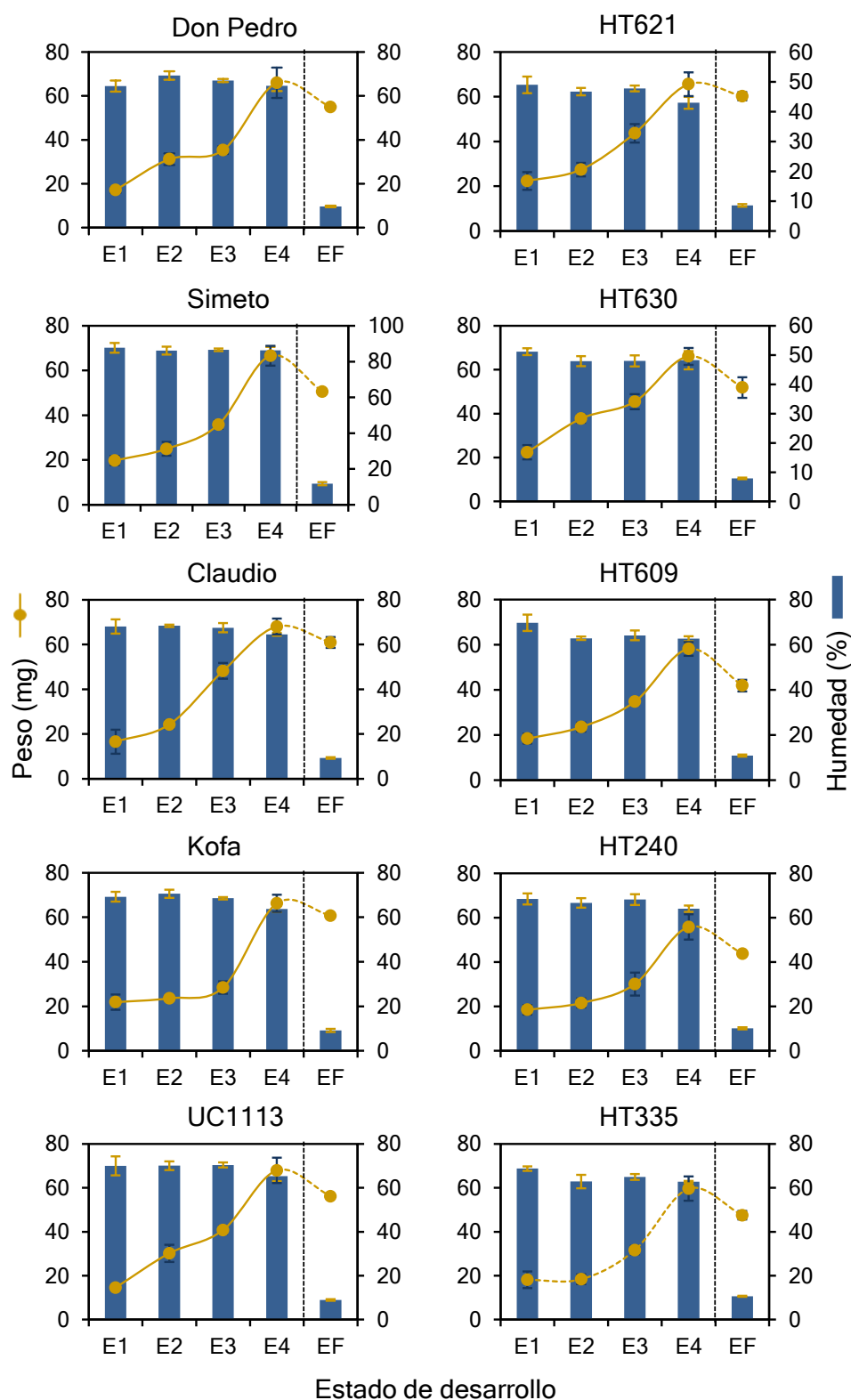


Figura 104. Evolución del peso (mg) y contenido en humedad (%) de los granos de cada variedad de trigo duro y tritordeum durante el desarrollo y maduración. Los valores mostrados representan la media y error estándar (peso: $n=6$; humedad: $n=4$) para cada estadio. Las Tablas A1 y A2 (Anexo) muestran el análisis de ANOVA y de significación estadística (test Duncan, $p<0.05$) para cada estadio con respecto a cada genotipo (trigo duro y tritordeum).

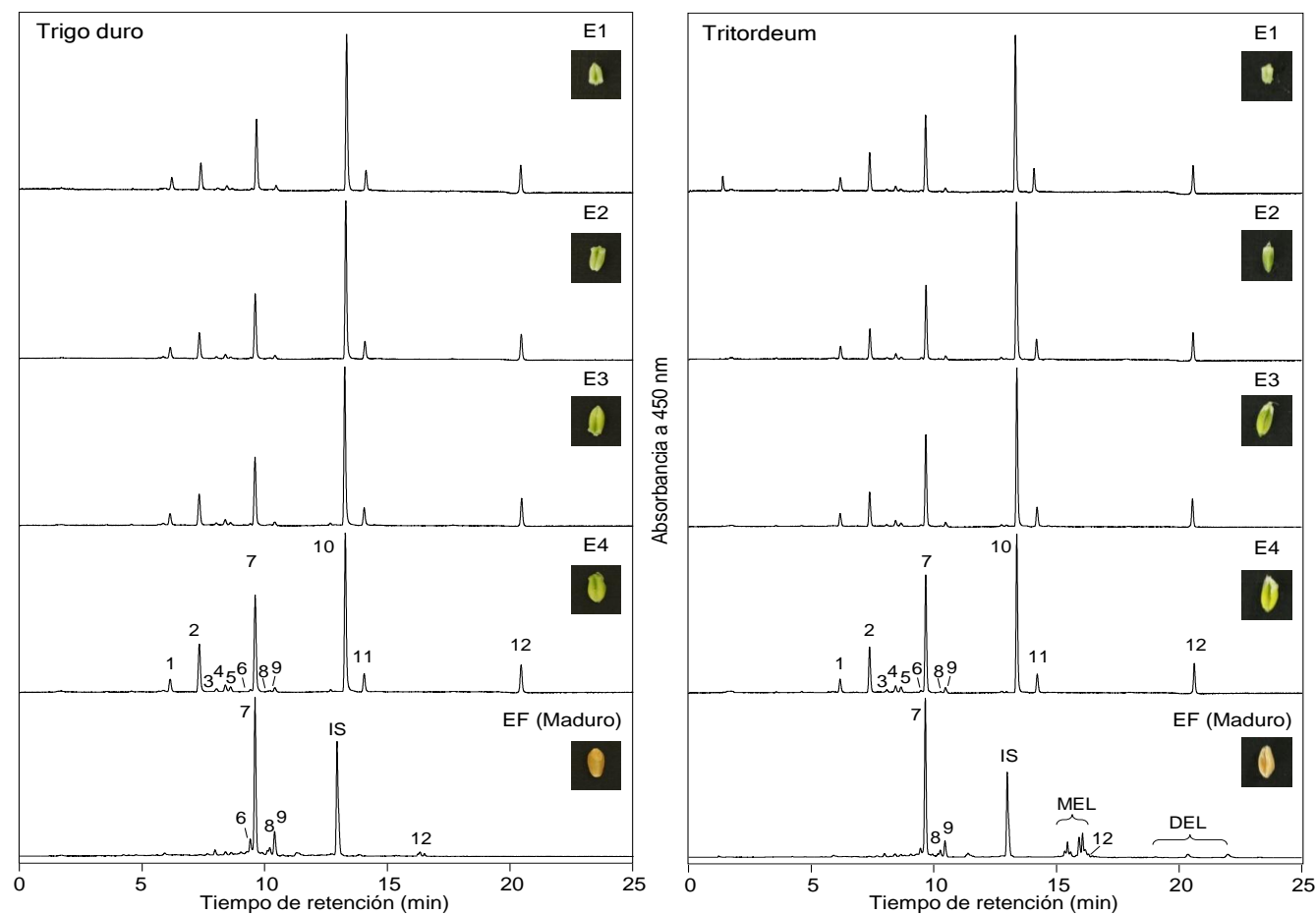


Figura 105. Cromatogramas de HPLC correspondientes al perfil de pigmentos cloroplásticos durante el desarrollo de granos de trigo duro (Don Pedro) y tritordeum (HT630). Picos: 1, 9'-*cis*-neoxanteno; 2, all-*trans*-violaxanteno; 3, 9-*cis*-violaxanteno; 4, 13-*cis*-violaxanteno; 5, all-*trans*-anteraxanteno; 6, all-*trans*-zeaxanteno; 7, all-*trans*-luteína; 8, 9-*cis*-luteína; 9, 13-*cis*-luteína; 10, clorofila *b*; 11, clorofila *a*; 12, all-*trans*-β-caroteno; MEL, monoésteres de luteína; DEL, diésteres de luteína; IS, patrón interno (all-*trans*-β-apo-8'-carotenal). Detección a 450 nm.



5.6.1.2. Perfil de pigmentos cloroplásticos durante el desarrollo y maduración de granos de trigo duro y tritordeum.

La **Figura 105** muestra los cromatogramas de HPLC correspondientes al perfil de pigmentos cloroplásticos para cada uno de los estadios de desarrollo de los granos de trigo duro y tritordeum, mostrando a modo de ejemplo los obtenidos para Don Pedro y HT630, respectivamente. Como era de esperar para un tejido vegetal verde, el perfil se correspondió con la composición típica de un tejido fotosintético, presentando los característicos pigmentos clorofílicos (clorofila *a* y *b*), así como un conjunto de carotenoides conformado mayoritariamente por luteína, violaxanteno, neoxanteno y β -caroteno, junto con contenidos menores de anteraxanteno y zeaxanteno. La **Figura 106** muestra las estructuras de dichos pigmentos. Este patrón de carotenoides cloroplásticos se encuentra altamente conservado en el reino vegetal (Strain, 1966; Gross, 1991), incluyendo las angiospermas, gimnospermas, algas verdes, pteridofitas y briofitas, ejerciendo funciones vitales a nivel de los procesos de fotoprotección, así como en el ensamblaje de los centros de reacción del fotosistema II y el desarrollo de la función de captación de energía lumínica (Pogson *et al.*, 1996; 1998; Lokstein *et al.*, 2002). Como se deduce de la mera observación de los cromatogramas, la composición cualitativa de pigmentos se mantuvo inalterada durante todo el proceso de desarrollo de los granos (estadios E1 a E4), cambiando únicamente en la fase de maduración (estadio maduro, EF), lo cual está en concordancia con estudios recientes realizados con granos en desarrollo de trigo duro y trigo harinero (Ramachandran *et al.*, 2010; Qin *et al.*, 2012). Estos cambios se analizarán a nivel cuantitativo y en detalle con posterioridad.

Dada la circunstancia de que la evolución y cambios en pigmentos que deseamos investigar durante el desarrollo y maduración de los granos acontece de forma simultánea a otros múltiples procesos bioquímicos que afectan y alteran el balance de materia de los mismos, se debe prestar un especial cuidado en el análisis de los resultados al objeto de identificar adecuadamente la posible concurrencia de fenómenos de biosíntesis y/o catabolismo. La simple observación del aspecto externo, especialmente el color, de los granos evidencia claramente que debe existir un proceso de catabolismo y desaparición de clorofilas en el estado maduro, probablemente controlado por rutas similares a las que operan en vegetales verdes senescentes y frutos en maduración (Hörtensteiner, 2006; Hörtensteiner y Kräutler, 2011). Sin embargo, no podemos realizar ninguna afirmación *a priori* de lo que pueda suceder con los pigmentos carotenoides. Los cambios descritos en el peso de los granos y la humedad de los mismos, están directamente asociados a cambios cuantitativos en diversos componentes, lo cual se pone especialmente en evidencia durante la etapa de llenado que se caracteriza por la acusada síntesis de hidratos de carbono, y que

en el presente estudio se desarrolla fundamentalmente durante el tránsito del estadio E3 a E4. Este hecho, unido a las diferencias en las tasas de síntesis y/o catabolismo de los diferentes componentes del grano conlleva que los correspondientes incrementos o descensos en concentración sean difíciles de detectar.

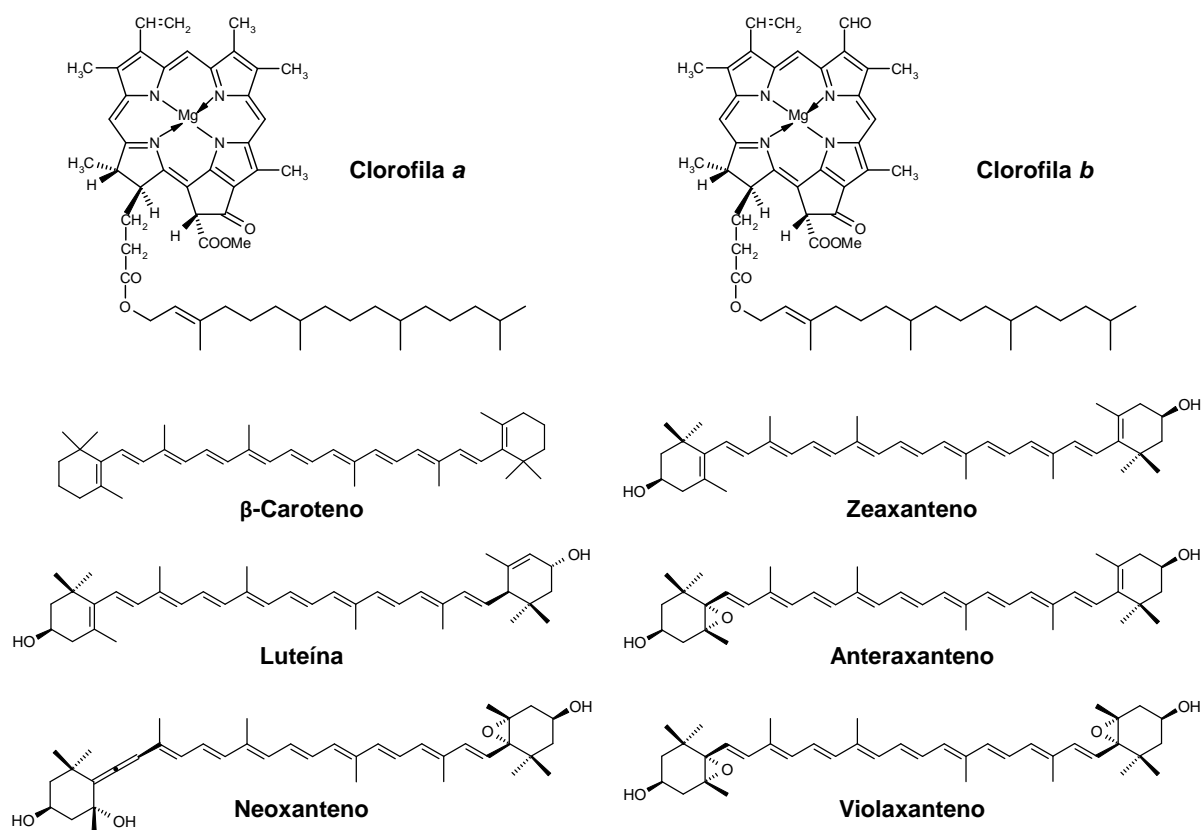


Figura 106. Estructura de los pigmentos cloroplásticos presentes en los granos de cereal en desarrollo.

Carotenoides

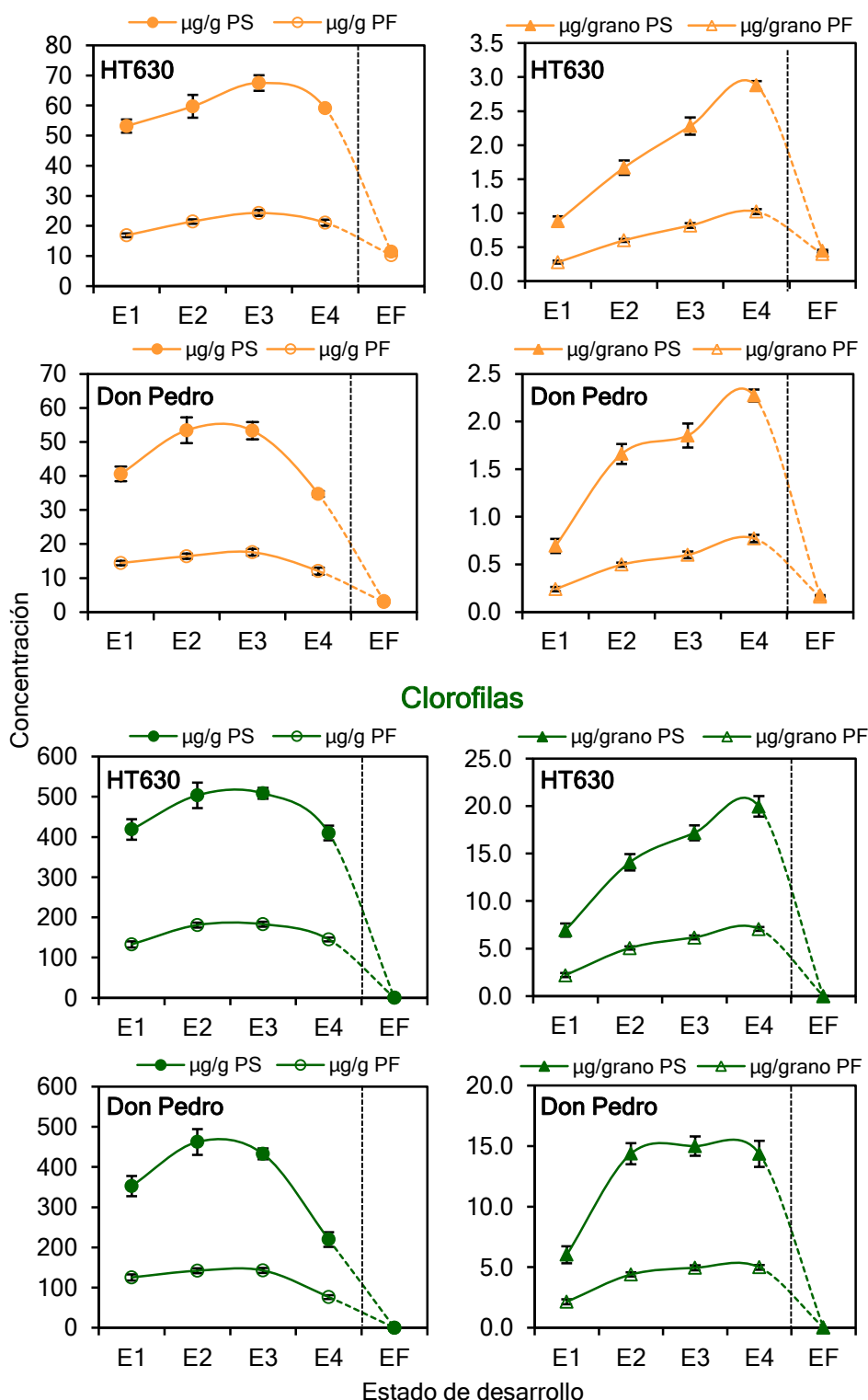


Figura 107. Evolución del contenido de clorofilas y carotenoides durante el desarrollo y maduración de granos de tritordeum (HT630) y trigo duro (Don Pedro) en función del sistema de expresión de concentración en base a peso de muestra ($\mu\text{g/g}$) y por unidad de grano ($\mu\text{g/grano}$), tanto en base fresca (PF) como seca (PS). Los valores mostrados representan la media y el error estándar para cada estadio (E1-E4 n=4; EF: n=8).

Además, debemos tener en cuenta que en el presente estudio se han analizado granos completos, que incluyen una mezcla de diferentes tipos de tejidos correspondientes a las diferentes partes del grano. Por lo tanto, la heterogeneidad en la distribución espacial de la acumulación de los pigmentos cloroplásticos (carotenoides y clorofilas) en los granos en desarrollo puede complicar la interpretación de los resultados al estar analizando simultáneamente los procesos de biosíntesis y catabolismo que afectan a estos pigmentos. En los granos de cereal encontramos principalmente tres componentes: pericarpio, endospermo y embrión (**Figura 97**). El pericarpio de los granos inmaduros contiene cloroplastos fotosintéticamente activos, mientras que estos no están presentes en el embrión, el endospermo y en el pericarpio de los granos maduros (Qin *et al.*, 2012). Durante el desarrollo del presente estudio resultó imposible la disección de los embriones correspondientes a cada estadio de desarrollo y la cuantificación de los pigmentos en éstos, sin embargo los resultados descritos por Panfili *et al.*, (2003) y por Ndolo y Beta (2013), así como los presentados con anterioridad en la presente memoria, han demostrado que el tejido embrionario contribuye en una pequeña proporción al contenido en carotenoide del grano maduro, siendo principalmente luteína, y algo de zeaxanteno y β -caroteno, los carotenoides encontrados. Podemos asumir, que los pigmentos analizados provienen en su mayor parte de los plastidios presentes en el endospermo (amiloplastos; LaCroix y Lier, 1975) en formación y del pericarpio (cloroplastos funcionales y senescentes), siendo éste último el tejido que probablemente contenga la mayor parte de las clorofilas y carotenoides asociados a los cloroplastos durante los estadios de desarrollo.

Al objeto de valorar y determinar la forma más adecuada para expresar y estudiar los datos de concentración de pigmentos y facilitar la interpretación de los mismos, los valores de contenido de pigmentos fueron expresados tanto en base materia fresca como seca, y a su vez por muestra en peso y por unidad de grano. La **Figura 107** muestra la evolución del contenido total de carotenoides y de clorofilas expresados en los cuatro sistemas de concentración, es decir como μg de pigmento por unidad de peso de grano ($\mu\text{g/g}$ PF y $\mu\text{g/g}$ PS, referidos a materia fresca y seca, respectivamente), así como μg de pigmento por unidad de grano ($\mu\text{g/grano}$ PF y $\mu\text{g/grano}$ PS, respectivamente), para todos los estadios analizados (E1-E4 y EF), utilizando a modo de ejemplo un trigo duro (Don Pedro) y un tritordeum (HT630). Como se puede observar claramente la expresión de los resultados en base a materia seca posibilita la comparación directa de los resultados obtenidos para los estadios de desarrollo (E1-E4) con el estadio maduro (EF), habida cuenta de los diferentes contenidos en humedad que presentan éstos, tal y como se mostró en las **Figuras 103 y 104**. El contraste es aún más acusado cuando se comparan los datos expresados por peso de muestra y por unidad de grano, de tal manera que al referir la



concentración de pigmentos por peso de muestra, el resultado se encuentra sin duda influenciado por los cambios en la tasa de crecimiento del grano, el cual es mucho más acusado en las últimas etapas de desarrollo (E3 y E4), coincidiendo con la etapa de llenado (**Figuras 103 y 104**), lo que contribuye a la observación de descensos en la concentración de pigmentos, tanto clorofilas como carotenoides, y por lo tanto induce a pensar en la existencia de procesos catabólicos asociados a las últimas fase del desarrollo. Sin embargo, la expresión de los resultados como contenido de pigmento por unidad de grano de cereal ($\mu\text{g/grano}$) permite aunar al mismo tiempo las variaciones del contenido de pigmentos con las que ocurren en el crecimiento del grano (dado principalmente por el peso, y en menor grado por el contenido de agua). En este caso los datos muestran claramente un aumento continuado del contenido de pigmentos clorofílicos y carotenoides durante el desarrollo del grano, evidenciando que las tasas de síntesis de pigmentos deben ser inferiores a la de formación de carbohidratos de reserva y de ahí los descensos en concentración encontrados al referir los resultados por unidad de peso. Por todo lo expuesto, el sistema de expresión de resultados de concentración de pigmentos adoptado en el presente estudio fue como microgramos de pigmentos por unidad de grano referido a materia seca ($\mu\text{g/grano PS}$).

La **Figura 108** resume la evolución comparada del contenido de clorofilas y carotenoides totales durante el desarrollo y maduración del grano. Los datos mostrados corresponden al promedio de las cinco variedades de cada una de las especies estudiadas, trigo duro y tritordeum. Las **Tablas A3-A12** del *Anexo* muestran de forma detallada los cambios en el contenido y perfil de pigmentos cloroplásticos para cada una de las variedades, incluyendo el análisis de significación estadística (test de Duncan, $p < 0.05$) para cada estadio. Como se observa ambos cereales siguieron pautas de desarrollo y crecimiento en consonancia con los estadios anteriormente descritos. Los valores de contenido en pigmentos clorofílicos y carotenoides fueron siempre significativamente superiores ($p < 0.05$) en los granos en desarrollo de trigo duro, con la salvedad del estadio inicial (**E1**) en el que ambos cereales mostraron valores similares, cuando apenas habían transcurrido 8 días desde la antesis. Este hecho podría estar relacionado con una mayor eficiencia fotosintética en trigo duro, que a su vez se traduciría en una mayor productividad agronómica. El perfil de evolución para el contenido de clorofilas y carotenoides fue muy similar al compararlo entre ambas especies, como también se deduce de la **Figura 109** donde se representa la evolución de la relación promedio de clorofilas totales a carotenoides. Este hecho apunta a la existencia de un control análogo de las rutas biosintéticas y fisiológicas asociadas al proceso de formación y catabolismo de pigmentos durante el desarrollo y maduración de los granos de trigo duro y tritordeum, lo cual está en

consonancia con otros estudios similares (Corona *et al.*, 1996; Pogson *et al.*, 1998). Los trabajos pioneros de Nielsen y Gough (1974) con mutantes *xantha* de cebada demostraron una inhibición en la acumulación de carotenoides cuando la síntesis de clorofilas se encontraba atenuada. La acumulación de otros antioxidantes, como tocoferoles, ha sido también observada durante el desarrollo de granos de cereales u otras semillas vegetales (DellaPenna y Pogson, 2006; Herchi *et al.*, 2011; Gutiérrez-González *et al.*, 2013). La detección de carotenoides desde los primeros estadios de desarrollo (E1) coincide con las observaciones de Howitt *et al.*, (2009) y sugiere un papel antioxidante de los carotenoides durante la morfogénesis de la semilla (Howitt y Pogson, 2006).

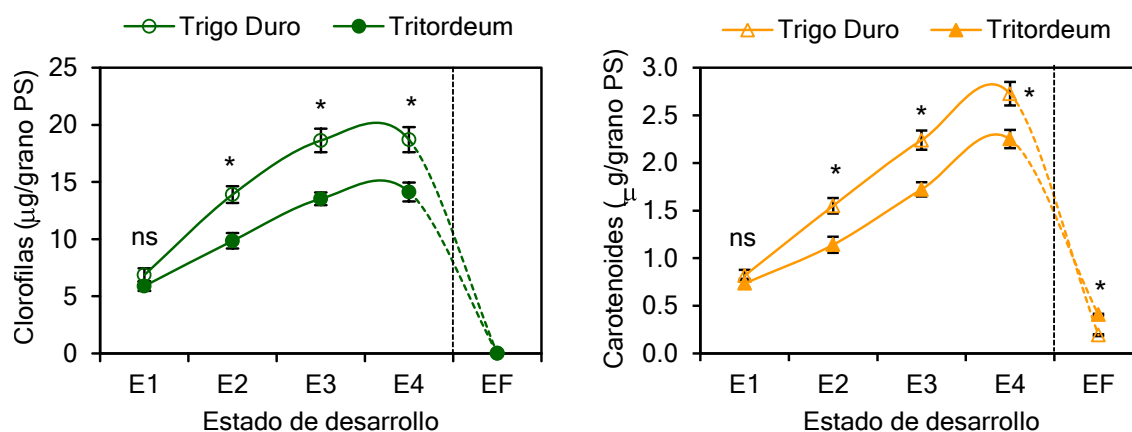


Figura 108. Evolución del contenido ($\mu\text{g/grano PS}$) de clorofilas y carotenoides durante el desarrollo y posterior maduración de granos de trigo duro y tritordeum. Los valores mostrados representan la media y el error estándar para cada estadio (E1-E4 $n=20$; EF: $n=40$) en el conjunto de cada genotipo estudiado, trigo duro (Don Pedro, Simeto, Claudio, Kofa y UC1113) y tritordeum (HT621, HT630, HT609, HT240 y HT335). Los valores marcados con un asterisco muestran diferencias significativas para un mismo estadio de desarrollo (test de Duncan, $p<0.05$). ns: diferencias no significativas.

La síntesis de ambas familias de pigmentos fue aparentemente más acusada en las dos primeras etapas del desarrollo (E1→E2 y E2→E3), ralentizándose en la última (E3→E4), especialmente para las clorofilas, lo cual evidencia un desplazamiento del equilibrio anabólico/catabólico traducido en menores tasas de reposición, siendo indicativo del inicio de los fenómenos de senescencia asociados a la maduración del grano, y que conllevan finalmente a la desaparición de las clorofilas en el estado de total madurez (EF). Teniendo en cuenta que cada una de las etapas estudiadas tiene una duración temporal diferente (E1→E2: 6 días; E2→E3: 4 días; E3→E4: 7 días), la representación de la tasa de formación neta normalizada de clorofilas y carotenoides resulta especialmente útil. La **Figura 110** muestra los datos obtenidos tras referir las variaciones en el contenido en

pigmentos respecto al valor de partida (extremo inferior) de cada etapa (normalización) y a la duración del periodo de tiempo correspondiente. De esta forma se aprecia claramente como las clorofilas fueron sintetizadas a tasas decrecientes conforme avanzó el proceso de desarrollo (la tasa máxima se observó para la primera etapa, E1→E2), que finalmente derivó en la desaparición de las mismas en el estado maduro, observándose que dicho proceso ocurrió más rápidamente en trigo duro que en tritordeum, presentando estos últimos tasas de síntesis de clorofilas diez veces superiores a trigo duro en la última etapa (E3→E4).

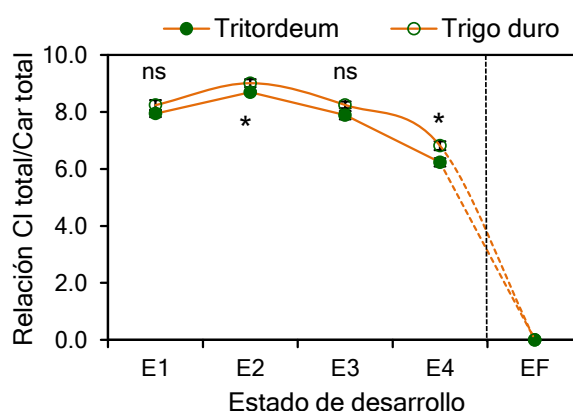


Figura 109. Evolución de la relación entre el contenido clorofilas totales y carotenoides totales durante el desarrollo y maduración de granos de trigo duro y tritordeum. Los valores mostrados representan la media y el error estándar para cada estadio (E1-E4 n=20; EF: n=40) en el conjunto de cada genotipo estudiado, trigo duro (Don Pedro, Simeto, Claudio, Kofa y UC1113) y tritordeum (HT621, HT630, HT609, HT240 y HT335). Los valores marcados con un asterisco muestran diferencias significativas para un mismo estadio de desarrollo (test de Duncan, $p < 0.05$). ns: diferencias no significativas.

Por el contrario, la síntesis de carotenoides siguió una pauta diferente en función de la especie, de tal manera que trigo duro presentó la tasa máxima de síntesis durante la primera etapa (E1→E2) decreciendo paulatinamente conforme progresó el desarrollo, de forma similar a las clorofilas, mientras que tritordeum presentó el máximo durante la segunda etapa (E2→E3). Este aspecto sugiere nuevamente la existencia de un proceso de desarrollo y maduración algo más rápido en trigo duro, al tiempo que indica la posible activación del proceso de carotenogénesis en tritordeum en estadios previos a la maduración y que pudiera estar relacionado con los mayores niveles de carotenoides encontrados en los granos maduros de esta especie. No sería muy aventurado pensar que durante las últimas etapas de desarrollo se vayan activando los procesos responsables de las actividades biosintéticas que determinan el perfil y los niveles de pigmentos carotenoides encontrados en el endospermo de los granos maduros, y los datos aquí

presentados así lo sugieren. Recientemente Qin *et al.*, (2012) han observado que los carotenoides, principalmente luteína, son activamente sintetizados en los granos maduros de trigo duro (*T. turgidum* ssp. *durum*) y de trigo harinero (*T. aestivum*), resultados que cambian sustancialmente la común percepción entre los investigadores de que los carotenoides son simplemente repuestos (turned over) durante el desarrollo del grano después de su biosíntesis inicial en los primeros estadios. El análisis de la expresión de genes relacionados con la carotenogénesis y sus precursores, que se presentará y discutirá posteriormente, aportará evidencias experimentales al respecto.

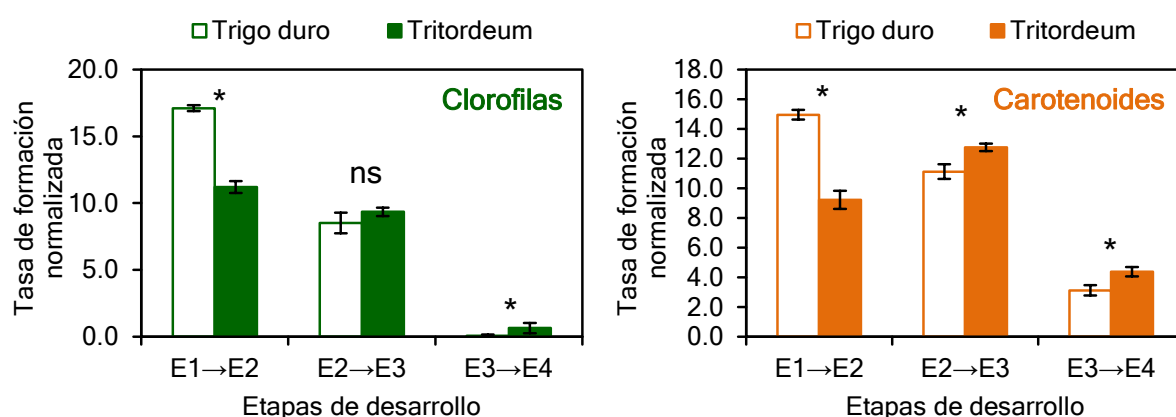


Figura 110. Tasas de formación neta normalizada de pigmentos clorofílicos y carotenoides (Δ Contenido normalizado ($\mu\text{g/grano PS}$)/duración etapa (días)) referidos a las etapas de desarrollo comprendidas entre estadios consecutivos (E1→E2; E2→E3; E3→E4). Los valores mostrados representan la media y el error estándar para cada etapa consecutiva ($n=20$) en el conjunto de cada genotipo estudiado, trigo duro (Don Pedro, Simeto, Claudio, Kofa y UC1113) y tritordeum (HT621, HT630, HT609, HT240 y HT335). Los valores marcados con un asterisco muestran diferencias significativas para una misma etapa de desarrollo (test de Duncan, $p<0.05$). ns: diferencias no significativas.

La **Figura 111** muestra la correlación existente entre el contenido carotenoide presente en el último estadio de desarrollo estudiado (E4) y el contenido encontrado en los granos maduros, apreciándose diferencias a nivel de especie. Las cinco líneas avanzadas de tritordeum presentaron niveles superiores de carotenoides con respecto a las variedades de trigo duro estudiadas, a pesar de que en el estadio E4 el contenido medio de carotenoides en trigo duro ($2.73 \pm 0.12 \mu\text{g/grano PS}$) fue significativamente ($p<0.05$) superior al de tritordeum ($2.25 \pm 0.10 \mu\text{g/grano PS}$). Dentro del grupo de tritordeum destacaron las líneas HT630 y HT621 por su alto contenido carotenoide, mientras que la variedad Kofa, tradicionalmente caracterizada por un alto valor de YPC, fue la variedad que destacó en el conjunto de trigos duros estudiados. Como ya se ha apuntado con



anterioridad, la aparición de los ésteres de luteína en el endospermo de los granos maduros de tritordeum podría ser uno de los factores determinantes de la mayor capacidad de síntesis y acumulación de xantofilas en este cereal, por lo que el desarrollo de investigaciones que avancen en el conocimiento del mecanismo y funciones de la esterificación de xantofilas en vegetales resultan de especial interés.

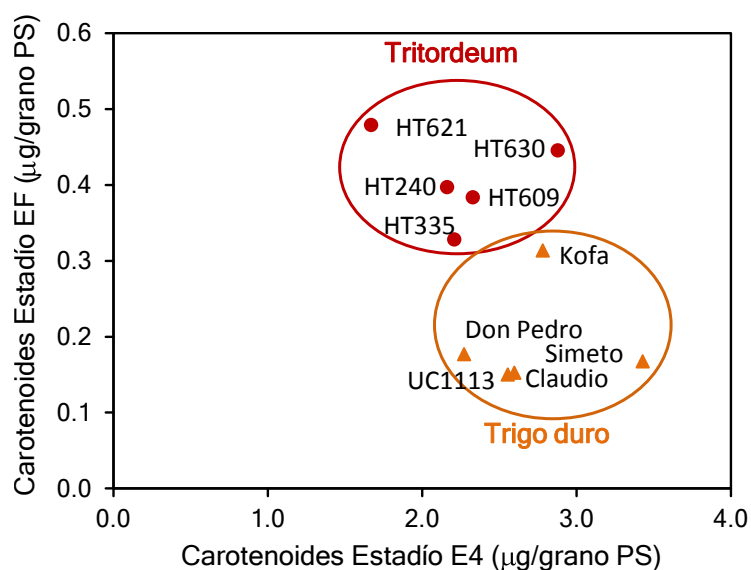


Figura 111. Correlación entre el contenido carotenoide presente en los granos al final del desarrollo (estadio E4; 25 DDA) y en los correspondientes granos maduros (estadio EF).

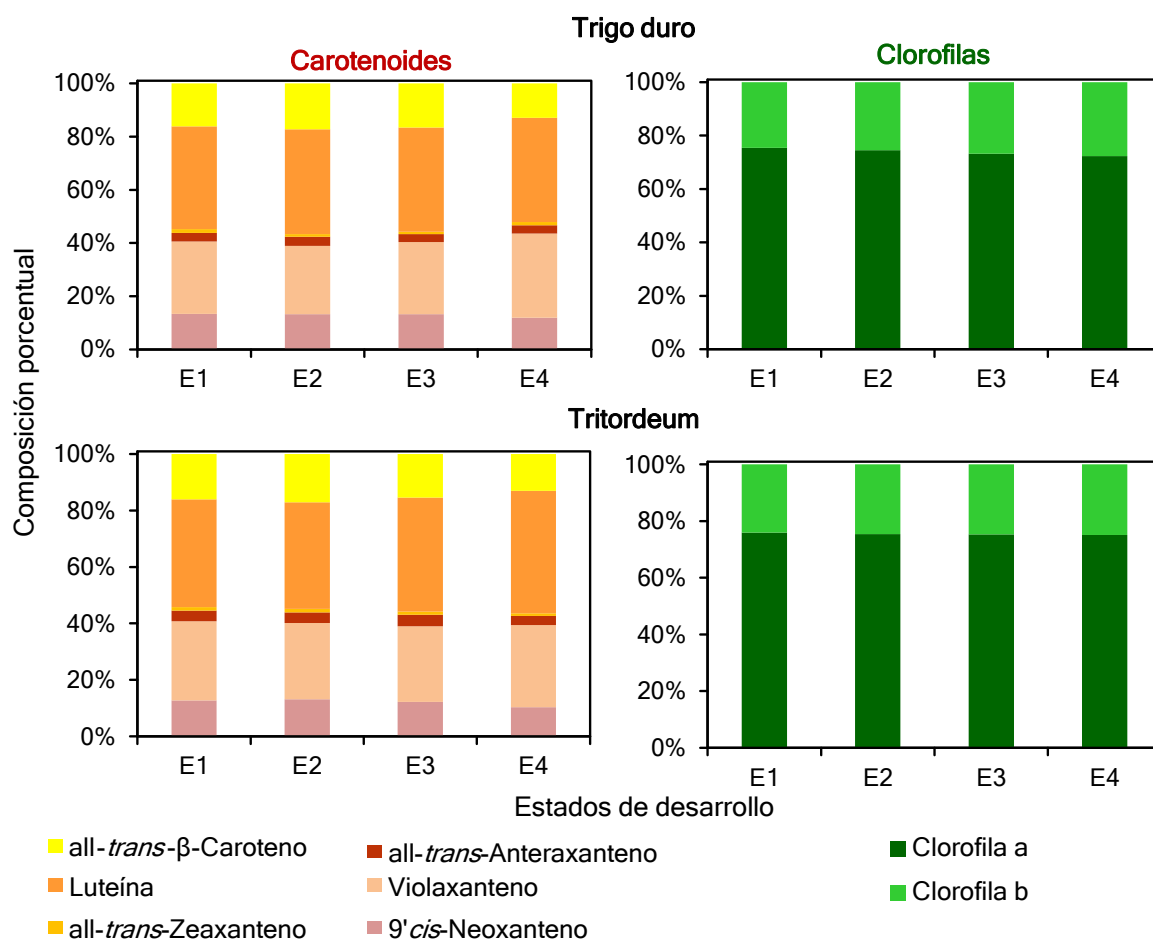


Figura 112. Evolución de la composición porcentual de carotenoides y clorofilas individuales durante el desarrollo de granos de trigo duro y tritordeum.

De manera análoga a lo expuesto hasta este momento, el análisis de los cambios que ocurren en la composición individual de pigmentos permite establecer analogías, y ciertas diferencias entre las especies estudiadas. Como se indicó anteriormente las **Tablas A3-A12** del *Anexo* resumen los datos de concentración en pigmentos para cada una de las variedades estudiadas. La **Figura 112** muestra la evolución de la composición de pigmentos cloroplásticos durante las fases de desarrollo estudiadas. Como puede comprobarse, la composición relativa no varió significativamente, indicando que las tasas de síntesis y reposición de todos los pigmentos fueron similares e independientes del estado de desarrollo.

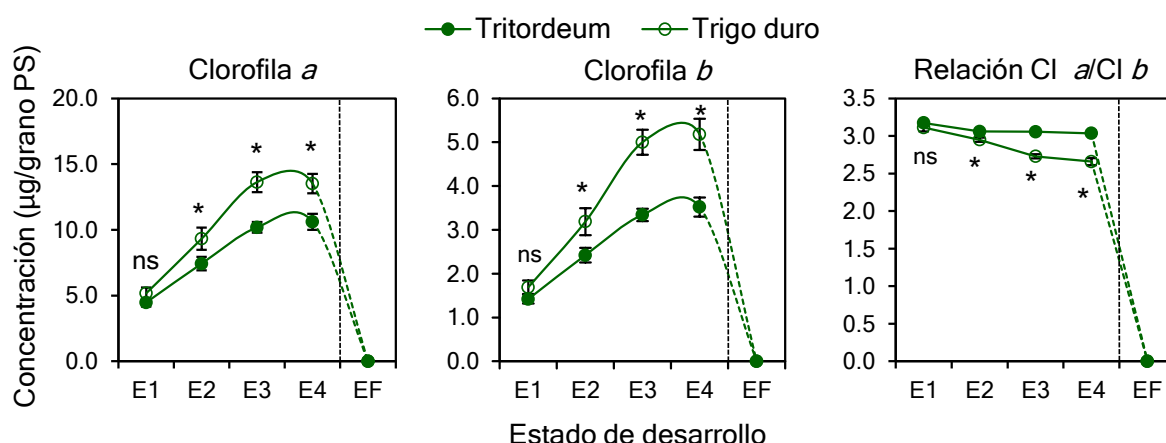


Figura 113. Cambios en la concentración ($\mu\text{g/grano PS}$) de pigmentos clorofílicos individuales, y relación entre los mismos, durante el desarrollo y maduración de granos de trigo duro y tritordeum. Los valores mostrados representan la media y el error estándar para cada estadio (E1-E4 $n=20$; EF: $n=40$) en el conjunto de cada genotipo estudiado, trigo duro (Don Pedro, Simeto, Claudio, Kofa y UC1113) y tritordeum (HT621, HT630, HT609, HT240 y HT335). Los valores marcados con un asterisco muestran diferencias significativas para un mismo estadio de desarrollo (test de Duncan, $p<0.05$). ns: diferencias no significativas.

La **Figura 113** describe la evolución del contenido promedio de clorofilas *a* y *b*, así como la relación entre ambas, para el conjunto de variedades de trigo duro y tritordeum consideradas. El patrón de evolución de cada clorofila de forma individualizada fue similar al observado para el contenido total de clorofilas (**Figura 108**), lo cual es lógico dada la constancia, dentro de unos límites estrechos, de la relación entre ambas clorofilas. Como en el resto de vegetales verdes, clorofila *a* estuvo presente a niveles superiores que clorofila *b*, en el rango de 2-3 veces (Pogson *et al.*, 1996; Žnidarčič *et al.*, 2011). Esto hecho es consistente con la función de la clorofila *a* como pigmento principal captador de energía lumínica en las plantas superiores, mientras que clorofila *b* actúa como un pigmento accesorio (Strain, 1966; Gross, 1991) que complementa parcialmente a la primera. Conforme progresó el desarrollo de los granos la relación $\text{Cl } a/\text{Cl } b$ mostró una tendencia generalizada hacia el descenso, el cual fue más acusado en trigo duro, que como recordaremos presentó una reducción más acusada en las tasas de síntesis de clorofilas totales durante el desarrollo.

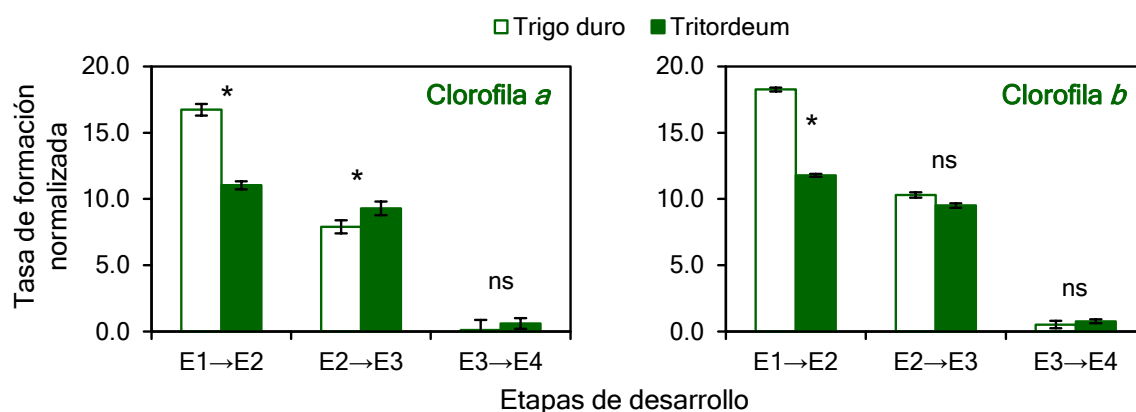


Figura 114. Tasas de formación neta normalizada de clorofilas *a* y *b* en relación a las etapas de desarrollo comprendidas entre estadios consecutivos (E1→E2; E2→E3; E3→E4). Los valores mostrados representan la media y el error estándar para cada etapa consecutiva (n=20) en el conjunto de cada genotipo estudiado, trigo duro (Don Pedro, Simeto, Claudio, Kofa y UC1113) y tritordeum (HT621, HT630, HT609, HT240 y HT335). Los valores marcados con un asterisco muestran diferencias significativas para una misma etapa de desarrollo (test de Duncan, $p < 0.05$). ns: diferencias no significativas.

La **Figura 114** describe los cambios en la tasa neta de formación de clorofila *a* y *b*, observándose como el comportamiento de ambas clorofilas fue idéntico en función de la especie. Las tasas de formación fueron superiores en trigo duro durante la primera etapa de desarrollo (E1→E2), igualándose con tritordeum a partir de la segunda etapa. Los descensos en las tasas de formación de clorofila *b* con respecto a las dos primeras etapas de desarrollo fueron menos acusados en tritordeum que en trigo duro, observándose consecuentemente descensos más acusados en la relación entre ambas clorofilas en trigo duro. Los valores superiores para la relación $Cl a/Cl b$ en tritordeum (con un valor promedio cercano a 3; **Figura 113**), y la mayor constancia en su valor, son características que podrían estar relacionadas con una mejor adaptación de esta especie a condiciones de alta irradiancia lumínica, en concordancia con numerosos estudios en plantas superiores (Yamamoto, 1979; Givnish, 1988; Yamazaki *et al.*, 2005). Clorofila *a* está asociada al centro de reacción, principalmente del fotosistema I (PSI), mientras que clorofila *b* lo está con los complejos antena del fotosistema II (PSII), por lo que dado que la abundancia de ambos sistemas se modula por las condiciones lumínicas del medio la relación $Cl a/Cl b$ es a menudo un buen indicador de la adaptación de las plantas a tales condiciones (Hornero-Méndez y Mínguez-Mosquera, 2001). En situaciones de maduración de frutos y senescencia de vegetales, la reducción en los valores de $Cl a/Cl b$ se ha explicado en términos catabólicos asociados a una desaparición más acusada de clorofila *a* debida a la

degradación preferente por parte de la enzima clorofilasa (Fiedor *et al.*, 1992; Mínguez-Mosquera y Gallardo-Guerrero, 1996; Schoch y Ihl, 1998).

En cuanto al seguimiento de los cambios en la composición de pigmentos carotenoides individuales (**Figura 115**) la mayoría de ellos experimentaron cambios análogos a los observados para el contenido carotenoide total (**Figura 108**). Los niveles de concentración fueron significativamente superiores ($p < 0.05$) en los granos de trigo duro en desarrollo, situación que se invirtió en el grano maduro, siendo tritordeum el de mayor contenido carotenoide en consonancia con los datos de caracterización de ambas especies que hemos ya expuesto en la presente memoria (Atienza *et al.*, 2007b; Mellado-Ortega y Hornero-Méndez, 2012). Dichas diferencias dependientes del genoma se pusieron de manifiesto a partir del estadio E2, no observándose variaciones significativas para el contenido de ninguno de los pigmentos en el primer estadio (E1), de manera análoga a lo observado para el contenido de clorofilas. Este hecho invita a pensar que el estadio E1 corresponde a un nivel de desarrollo muy primario que para especies tan próximas resulta difícil encontrar diferencias metabólicas detectables. Para todos los estados de desarrollo considerados los pigmentos mayoritarios fueron, en orden decreciente de concentración, luteína (all-*trans*-luteína, junto con pequeñas cantidades de 9-*cis*- y 13-*cis*-luteína), violaxanteno (all-*trans*-violaxanteno + 9-*cis*-violaxanteno + 13-*cis*-violaxanteno), 9'-*cis*-neoxanteno y β -caroteno. Además se cuantificaron all-*trans*-anteraxanteno y all-*trans*-zeaxanteno en niveles considerablemente inferiores, los cuales solo mostraron diferencias asociadas a la especie en el último estadio de desarrollo (E4), siendo especialmente relevante la diferencia encontrada para zeaxanteno, cuyos niveles fueron prácticamente duplicados en trigo duro. Se trata pues del perfil típico de carotenoides cloroplásticos. Tal y como se describió en las **Figuras 29 y 36** la formación de todos estos pigmentos está interrelacionada a través de la ruta de carotenogénesis que opera en tejidos fotosintéticamente activos. Esta ruta se caracteriza por la existencia de dos ramas que se generan por la ciclación de licopeno (como precursor) por concurso de la licopeno β -ciclase (β LCY) y de la licopeno ϵ -ciclase (ϵ LCY), que producen respectivamente anillos β y ϵ . La acción simultánea de β LCY en ambos extremos de la molécula de licopeno genera β -caroteno, mientras que la acción combinada de β LCY y ϵ LCY conduce a la formación de α -caroteno, aunque este último se detecta habitualmente en niveles muy reducidos (Frank y Cogdell, 1996). Transformaciones posteriores de α -caroteno y β -caroteno mediante hidroxilaciones, epoxidaciones y determinados reordenamientos internos dan lugar a dos familias de carotenoides a los que nos referiremos como rama $\beta\epsilon$ y rama $\beta\beta$, respectivamente. Resulta poco habitual la formación de carotenoides con dos anillos ϵ por



acción exclusiva de ϵ LCY, como es el caso de lactucaxanteno en ciertas variedades de lechuga (*Lactuca sativa*). En nuestro caso, al igual que en la mayoría de tejidos cloroplásticos estudiados, la rama $\beta\beta$ estuvo conformada por β -caroteno, zeaxanteno (derivado dihidroxilado de β -caroteno), anteraxanteno (derivado monoepoxidado de zeaxanteno), violaxanteno (derivado diepoxidado de zeaxanteno) y neoxanteno (derivado de violaxanteno por reorganización estructural), mientras que la rama $\beta\epsilon$ estuvo casi exclusivamente compuesta por luteína (derivado dihidroxilado de α -caroteno). A su vez violaxanteno, anteraxanteno y zeaxanteno están interrelacionados, al margen de la ruta biosintética, a través del *Ciclo del Violaxanteno*, mecanismo de disipación de exceso de energía lumínica mediante deepoxidación que es revertido en ausencia de luz. Dado que las muestras objeto de estudio fueron colectadas a primeras horas de la mañana, cuando la incidencia de radiación lumínica es bajo, los bajos niveles encontrados en nuestras muestras para anteraxanteno, y en especial de zeaxanteno, se correlacionan perfectamente con la operatividad de dicho ciclo. Cabe destacar el comportamiento de β -caroteno y 9'-*cis*-neoxanteno, los cuales dentro del conjunto de pigmentos mayoritarios fueron los que presentaron un perfil de evolución más suave. El carácter de β -caroteno como precursor general del resto de pigmentos de la rama $\beta\beta$ pudiera ser responsable de esta observación (Fraser y Bramley, 2004; Cuttriss *et al.*, 2007b, 2011). Por otro lado, 9'-*cis*-neoxanteno es considerado el precursor principal del ácido abscísico (ABA), una hormona vegetal con importantes funciones durante muchas fases del ciclo de vida de las plantas, como el desarrollo y dormancia de semillas y órganos de reserva (tubérculos) así como diversas respuestas a condiciones de estrés ambiental (Seo y Koshiba, 2002; Nambara y Marion-Poll, 2003; 2005; Frey *et al.*, 2006).

Nuevamente resulta interesante el análisis de la evolución de las tasas de formación neta de los pigmentos individuales con respecto a las tres etapas de desarrollo. Como puede observarse en la **Figura 116**, se advierten con claridad diferencias a nivel de especie, de tal forma que la mayoría de pigmentos en tritordeum muestran tasas de formación máximas durante la segunda etapa de desarrollo ($E2 \rightarrow E3$), mientras que en trigo duro el máximo de tasa de síntesis neta se observó en la primera etapa, decreciendo acusadamente para las etapas posteriores. No obstante se observaron ciertas excepciones, siendo la más patente el comportamiento de zeaxanteno, que experimentó un ascenso en la tasa de síntesis en trigo duro, probablemente en respuesta a la activación durante las dos últimas etapas de los procesos que determinarán la composición carotenoide del grano maduro, ya que como recordaremos zeaxanteno está presente en los granos de trigo duro, mientras que está ausente en tritordeum. En cualquier caso, la acumulación de zeaxanteno

también estará mediada por la reducción paulatina en la síntesis de pigmentos como violaxanteno, anteraxanteno y 9'-*cis*-neoxanteno, de los cuales es precursor, aunque este hecho es común en ambos tipos de cereales y por tanto no parece que pueda ser la causa principal de dicha acumulación.

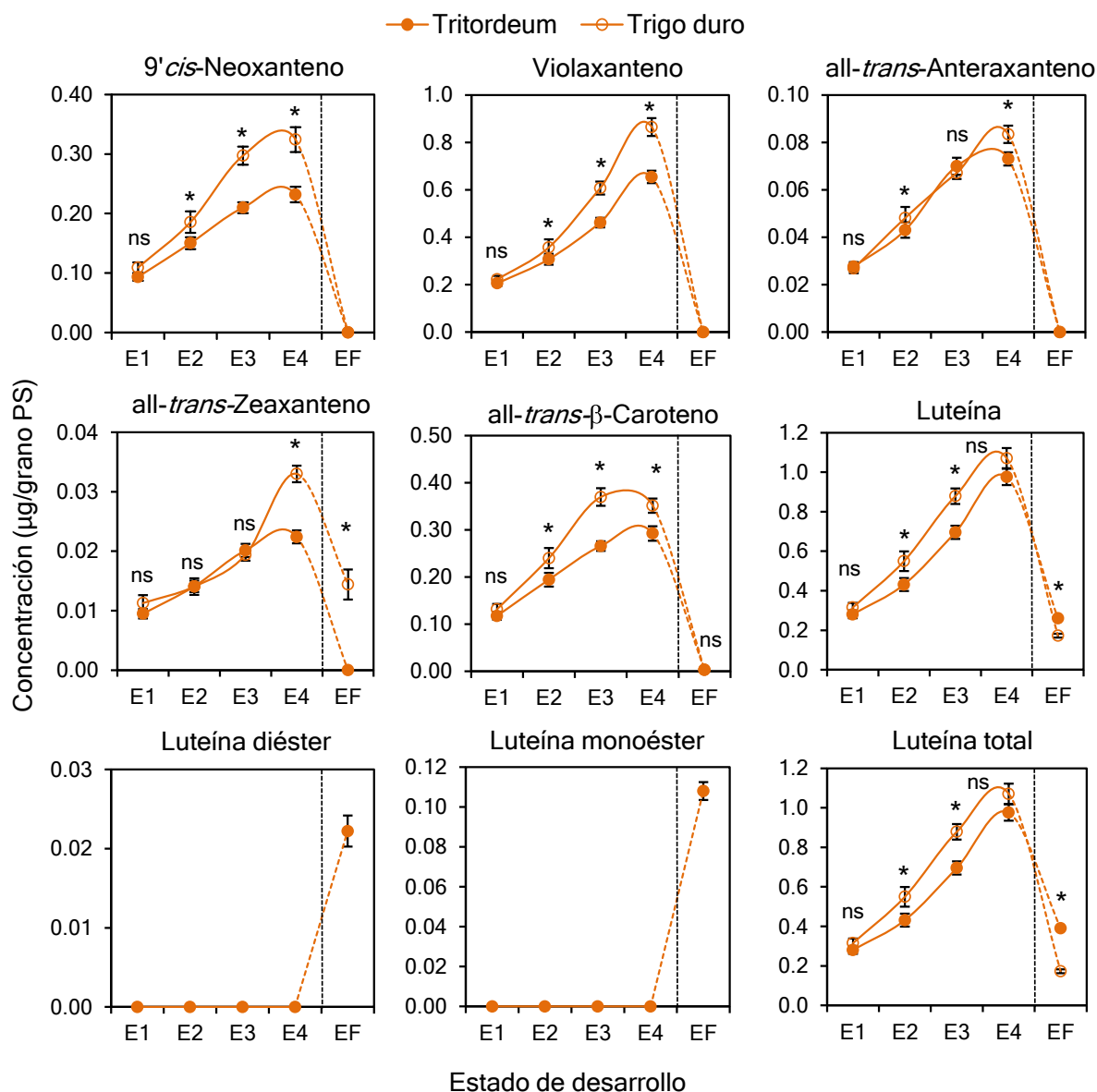


Figura 115. Cambios en la concentración (µg/grano PS) de pigmentos carotenoides individuales durante el desarrollo y maduración de granos de trigo duro y tritordeum. Los valores mostrados representan la media y el error estándar para cada estadio (E1-E4 n=20; EF: n=40) en el conjunto de cada genotipo estudiado, trigo duro (Don Pedro, Simeto, Claudio, Kofa y UC1113) y tritordeum (HT621, HT630, HT609, HT240 y HT335). Los valores marcados con un asterisco muestran diferencias significativas para un mismo estadio de desarrollo (test de Duncan, $p < 0.05$). ns: diferencias no significativas. Violaxanteno = *all-trans*-Violaxanteno + 9'-*cis*-Violaxanteno + 13'-*cis*-Violaxanteno; Luteína = Luteína libre (*all-trans*-Luteína + 9'-*cis*-Luteína + 13'-*cis*-Luteína); Luteína monoéster = Luteína-3'-O-palmitato + Luteína-3-O-palmitato + Luteína-3'-O-linoleato + Luteína-3-O-linoleato; Luteína diéster = Luteína-dipalmitato + Luteína-dilinoleato + Luteína-palmitatolinoleato; Luteína total = Luteína libre + Luteína monoéster + Luteína diéster.

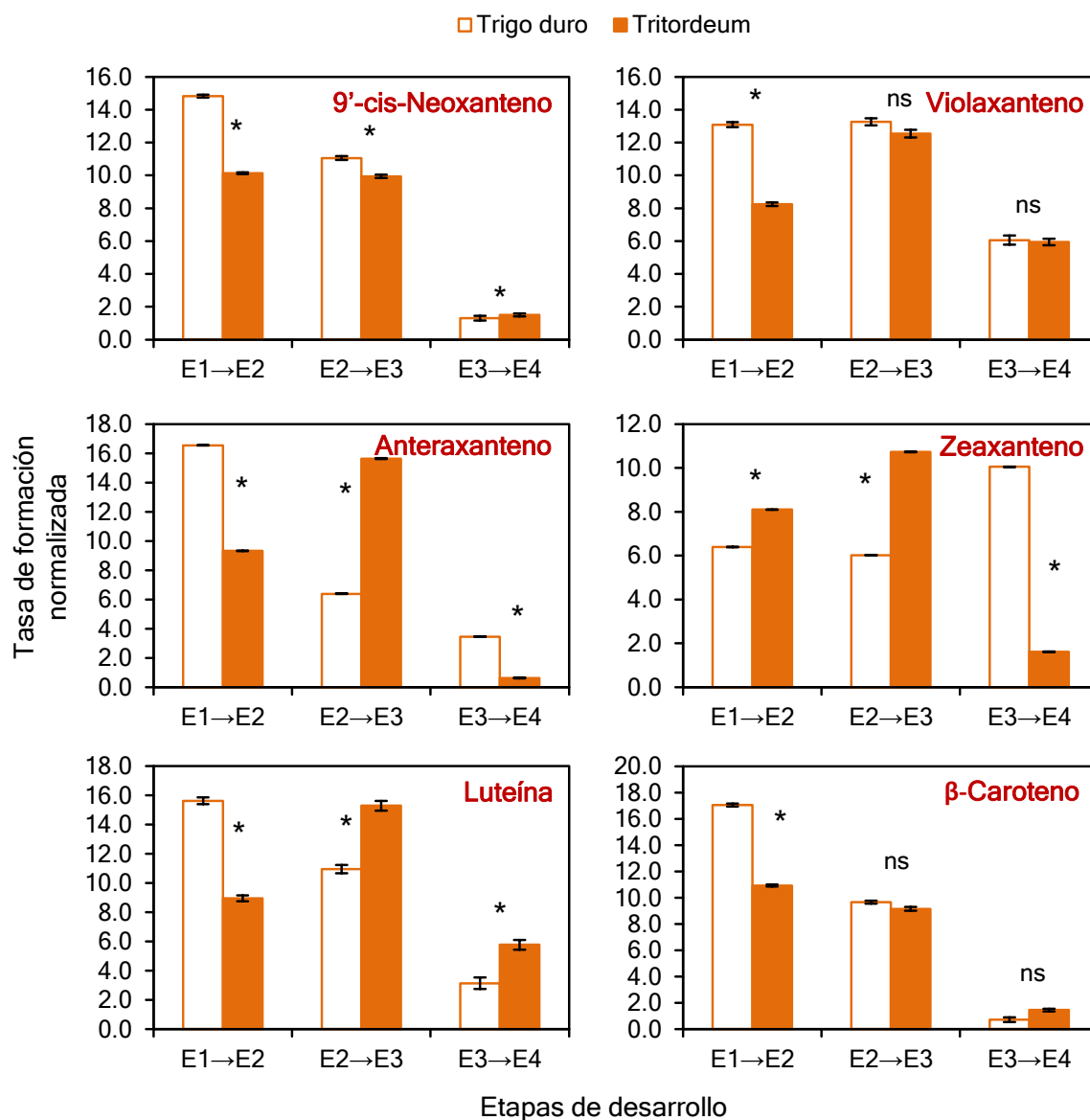


Figura 116. Tasas de formación neta normalizada de los pigmentos carotenoides individuales en relación a las etapas de desarrollo comprendidas entre estadios consecutivos (E1→E2; E2→E3; E3→E4). Los valores mostrados representan la media y el error estándar para cada etapa consecutiva (n=20) en el conjunto de cada genotipo estudiado, trigo duro (Don Pedro, Simeto, Claudio, Kofa y UC1113) y tritordeum (HT621, HT630, HT609, HT240 y HT335). Los valores marcados con un asterisco muestran diferencias significativas para una misma etapa de desarrollo (test de Duncan, $p < 0.05$). ns: diferencias no significativas.



La importancia relativa de las ramas $\beta\epsilon$ y $\beta\beta$ se pone de manifiesto mediante la relación entre el contenido de ambos grupos de pigmentos, y que en cierta manera nos indica el mayor o menor flujo de metabolitos por una u otra ruta a lo largo del proceso de desarrollo. Como se muestra en la **Figura 117** se observaron diferencias significativas entre trigo duro y tritordeum, de tal manera que en los primeros se observó una aparente constancia durante todo el desarrollo, mientras que en tritordeum se puso de manifiesto un aumento progresivo de la relación, lo cual está en consonancia con lo encontrado por Qin *et al.*, (2012) durante el desarrollo de trigo duro entre 4 y 25 DDA. Tales diferencias se maximizaron en el estado maduro (EF) donde el valor de la relación de las ramas $\beta\epsilon$ y $\beta\beta$ alcanzó valores 12 veces superiores en tritordeum con respecto a trigo duro. Este hecho estaría parcialmente explicado por la desaparición total de violaxanteno, 9'-*cis*-neoxanteno y anteraxanteno en el pericarpio del grano maduro de ambos cereales, así como por la desaparición total y consecuente ausencia de zeaxanteno (como recordaremos esta es una de las características diferenciadoras y singular de tritordeum) en los granos maduros de tritordeum, y los mayores contenidos de luteína de éstos últimos en relación con los granos maduros de trigo duro. Situaciones similares se han identificado durante el desarrollo de granos café y maíz dulce, en los cuales se acumula principalmente luteína (Kurilich y Juvik, 1999; Simkin *et al.*, 2010). Por el contrario, la carotenogénesis durante el desarrollo de granos de sorgo conduce a una acumulación preferencial de zeaxanteno (Kean *et al.*, 2007) por lo que debe existir un control fino del proceso carotenogénico en el que sin duda el genotipo debe tener un papel determinante. Como ya se ha apuntado, la aparición de los característicos ésteres de luteína en el endospermo de tritordeum podría ser responsable de la mayor capacidad de síntesis y acumulación en los granos maduros de esta especie. Adicionalmente la capacidad de acumulación de pigmentos vendrá determinada por la disponibilidad de estructuras apropiadas para el almacenamiento de éstos, por lo que los procesos de génesis de plastidios especializados en la acumulación de xantofilas y carotenos (cloroplastos y cromoplástos principalmente) ha sido apuntada como un mecanismo determinante ((Lu y Li, 2008; Cazzonelli y Pogson, 2010). Los trabajos realizados con mutantes de tomate *high-pigment 2* y 3 (Kolotilin *et al.*, 2007; Galpaz *et al.*, 2008) y el mutante en el gen *Or* de coliflor (Li *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2006) así lo constatan. No obstante, también habrá que considerar que el concurso de enzimas degradativas como peroxidasas y lipoxigenasas, durante el proceso final de maduración del grano (tránsito de E4 a EF) podría afectar a la retención de pigmentos, desencadenando en parte las diferencias observadas entre especies (Hessler *et al.*, 2002; Leenhardt *et al.*, 2006a; Carrera *et al.*, 2007; Hidalgo y Brandolini, 2012).

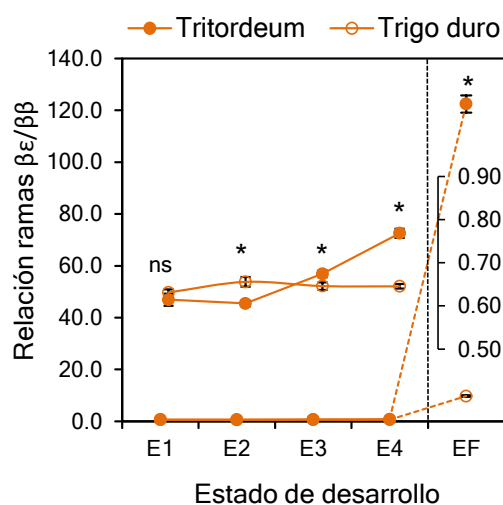


Figura 117. Evolución de la relación entre los carotenoides de las ramas $\beta\epsilon$ y $\beta\beta$ de la ruta carotenogénica durante el desarrollo y maduración de granos de trigo duro y tritordeum. Rama $\beta\epsilon$ = all-*trans*-Luteína + isómeros *cis* + monoésteres + diésteres; Rama $\beta\beta$ = 9'-*cis*-Neoxanteno + Violaxanteno (all-*trans* e isómeros *cis*) + all-*trans*-Antheraxanteno + all-*trans*-Zeaxanteno + all-*trans*- β -Caroteno. Los valores mostrados representan la media y el error estándar para cada estadio (E1-E4 n=20; EF: n=40) en el conjunto de cada genotipo estudiado, trigo duro (Don Pedro, Simeto, Claudio, Kofa y UC1113) y tritordeum (HT621, HT630, HT609, HT240 y HT335). Los valores marcados con un asterisco muestran diferencias significativas para un mismo estadio de desarrollo (test de Duncan, $p < 0.05$). ns: diferencias no significativas. La zona comprendida entre los estadios E1 y E4 ha sido ampliada para mayor claridad.

Estudios relacionados con el flujo de metabolitos durante la carotenogénesis en trigo apuntan claramente a la ciclación de licopeno como un paso regulatorio importante para la acumulación de xantofilas en cereales (Ramachandran *et al.*, 2010). Variaciones genéticas o determinadas mutaciones que afecten a la actividad enzimática de LCYB y LCYE podría estar influyendo en el comportamiento diferenciable de los ratios de ambos conjuntos de muestras, trigos y tritordeum (Harjes *et al.*, 2008; Howitt *et al.*, 2009). Trabajos recientes sobre variabilidad genética en trigos concluyen que el genotipo tiene un impacto más relevante que el ambiente sobre el contenido carotenoides (Lachman *et al.*, 2013), por lo que existe un gran potencial para explotar cultivares o genotipos con alelos favorables relacionados con propiedades beneficiosas para la salud como es el caso de tritordeum.

Por último, debemos destacar como la característica presencia de ésteres en el grano maduro (EF) de tritordeum, y la no detección de estos en los estadios de desarrollo, aportan evidencias que indican que su formación tiene lugar activamente durante la etapa de madurez del grano, una vez completada la formación del mismo. En el presente estudio, el periodo de tiempo transcurrido entre el último estado de madurez estudiado (E4) y el grano maduro recolectado fue tan solo de 5 días, por lo que en un futuro pretendemos



caracterizar en detalle los cambios que afectan a los pigmentos durante esta etapa de maduración, con especial atención al proceso de esterificación. Estos resultados son también concordantes con los resultados obtenidos por Howitt *et al.*, (2009) en trigos harineros, observando la presencia de ésteres exclusivamente en los granos maduros y a partir de 30 DDA. Desde un punto de vista cuantitativo, la comparación entre las fases de desarrollo (E1-E4) y el estadio final entre ambos tipos de cereales implica la existencia de otros factores genéticos y/o ambientales, sumados a los de la propia síntesis de pigmentos carotenoides, que deben de intervenir produciendo finalmente las diferencias observadas para ambas especies. El hecho de que durante el proceso de desarrollo del grano sea trigo duro el cereal que mostró mayores niveles de carotenoides, situación inversa para el grano maduro, podría implicar una mayor capacidad de retención y almacenamiento de los pigmentos por parte de tritordeum (Rodríguez-Suárez *et al.*, 2010) durante el proceso de maduración, el cual podría estar facilitado por la esterificación de éstos (Mellado-Ortega y Hornero-Méndez, 2012). No solo la tasa de biosíntesis sino también la habilidad de las células para almacenar carotenoides son factores importantes que determinan el nivel de pigmentos que puede encontrarse en un tejido vegetal (Atienza *et al.*, 2008; Hannoufa y Hossain, 2012). Como ya se ha analizado con anterioridad (Atienza *et al.*, 2007b) (y constatado en el apartado de caracterización de la presente Tesis Doctoral) el genoma de *H. chilense* en tritordeum podría ser responsable del incremento en la esterificación de luteína, apuntando indudablemente un origen genético para este carácter en tritordeum. Análisis recientes del genoma de *H. chilense* apuntan a que los genes implicados en la esterificación de carotenoides podrían ubicarse en el brazo largo del cromosoma 2 (Rodríguez-Suárez y Atienza, 2012). Esto abre nuevas posibilidades para localizar los genes responsables de dicho carácter y estudiar el patrón del mismo. Resulta especialmente interesante destacar que un QTL para ésteres de luteína fue identificado sobre el cromosoma 2B de trigo harinero (Howitt *et al.*, 2009). Esto indica, cómo se comentó antes, que se trata de un proceso enzimático específico en el que deben de intervenir aciltransferasas específicas y desconocidas hasta el momento (Mellado-Ortega y Hornero-Méndez, 2012). Hasta la fecha no se ha caracterizado el proceso de maduración del grano de los cereales en relación a la síntesis y acumulación de pigmentos carotenoides, siendo ésta un área que debemos explorar, en especial en lo relativo a las condiciones de almacenamiento de los granos recolectados durante el periodo de postrecolección, y el efecto que dichas condiciones puedan ejercer sobre carotenogénesis y/o estabilidad de los mismos. A tal fin en la presente memoria se mostrarán más adelante los resultados obtenidos al respecto, demostrando inequívocamente el efecto modulador de



la condiciones de almacenamiento sobre la síntesis de pigmentos, y de la esterificación en su caso, así como la influencia de los factores genéticos.

5.6.2. Análisis de expresión de genes carotenogénicos durante el desarrollo de granos de trigo duro y tritordeum.

Al objeto de establecer el origen de las diferencias encontradas a nivel de especie para el perfil y evolución de los pigmentos carotenoides durante el desarrollo y maduración de los granos, y en especial en el estado de total madurez, y determinar si éstas se deben a una expresión diferencial de los genes carotenogénicos involucrados, se llevó a cabo el seguimiento de los correspondientes transcritos mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR). Para tal fin se seleccionaron genes involucrados en la producción y flujo de precursores de la ruta MEP (*Dxr*, *Hdh*) y genes específicos de la ruta de carotenogénesis (*Ggpps1*, *Psy1*, *Psy2*, *Pds*, *Zds*, β LCY y ϵ LCY). La descripción de estos genes y las correspondientes enzimas codificadas fueron descritas en la sección de antecedentes. Cabe señalar, que no fue posible el seguimiento de los genes (*Hyd*) que codifican para las enzimas hidroxilasas, responsables últimos de la formación de luteína y zeaxanteno a partir de α y β -caroteno respectivamente, debido a problemas con el diseño de cebadores específicos. En la **Figura 118** se muestran los datos de expresión relativa (abundancia de transcritos) de los genes seleccionados para trigo duro y tritordeum durante el desarrollo del grano. A primera vista, los datos obtenidos revelaron que todos los genes estudiados se expresaron en ambas especies y para todos los estados de desarrollo. Al margen de algunas excepciones importantes, que comentaremos a continuación, el patrón de expresión para la mayoría de los genes analizados resultó ser similar en ambas especies, existiendo diferencias a nivel de la abundancia de transcritos. Llama la atención la falta de correlación aparente entre el patrón de expresión de los genes estudiados y la evolución del perfil de pigmentos durante los estadios de desarrollo, lo cual ya ha sido observado en estudios similares (Alquézar *et al.*, 2008; Matsumoto *et al.*, 2009; Fu *et al.*, 2012; Qin *et al.*, 2012). Esta falta de correlación entre expresión génica, actividad enzimática y niveles de carotenoides, sugiere la implicación de múltiples mecanismos de regulación de carotenogénesis a nivel post-transcripcional, traduccional y finalmente de actividad enzimática (Bramley, 2002; Cunningham, 2002), junto con la coexistencia de procesos de catabolismo de pigmentos, que pueden dificultar bastante el estudio de los resultados. Es lógico pensar que deba existir un desfase entre la composición carotenoide de los granos para un estado de desarrollo dado, y la expresión génica medida en los mismos, puesto que el resultado de ésta última no se verá reflejada en ese momento sino en estados

posteriores. Para facilitar la discusión de los resultados, la **Figura 119** muestra un esquema simplificado de la ruta de carotenogénesis en plantas superiores, con indicación de los carotenoides y genes estudiados (para más detalles consultar las **Figuras 29** y **36** de la sección de *Antecedentes*).

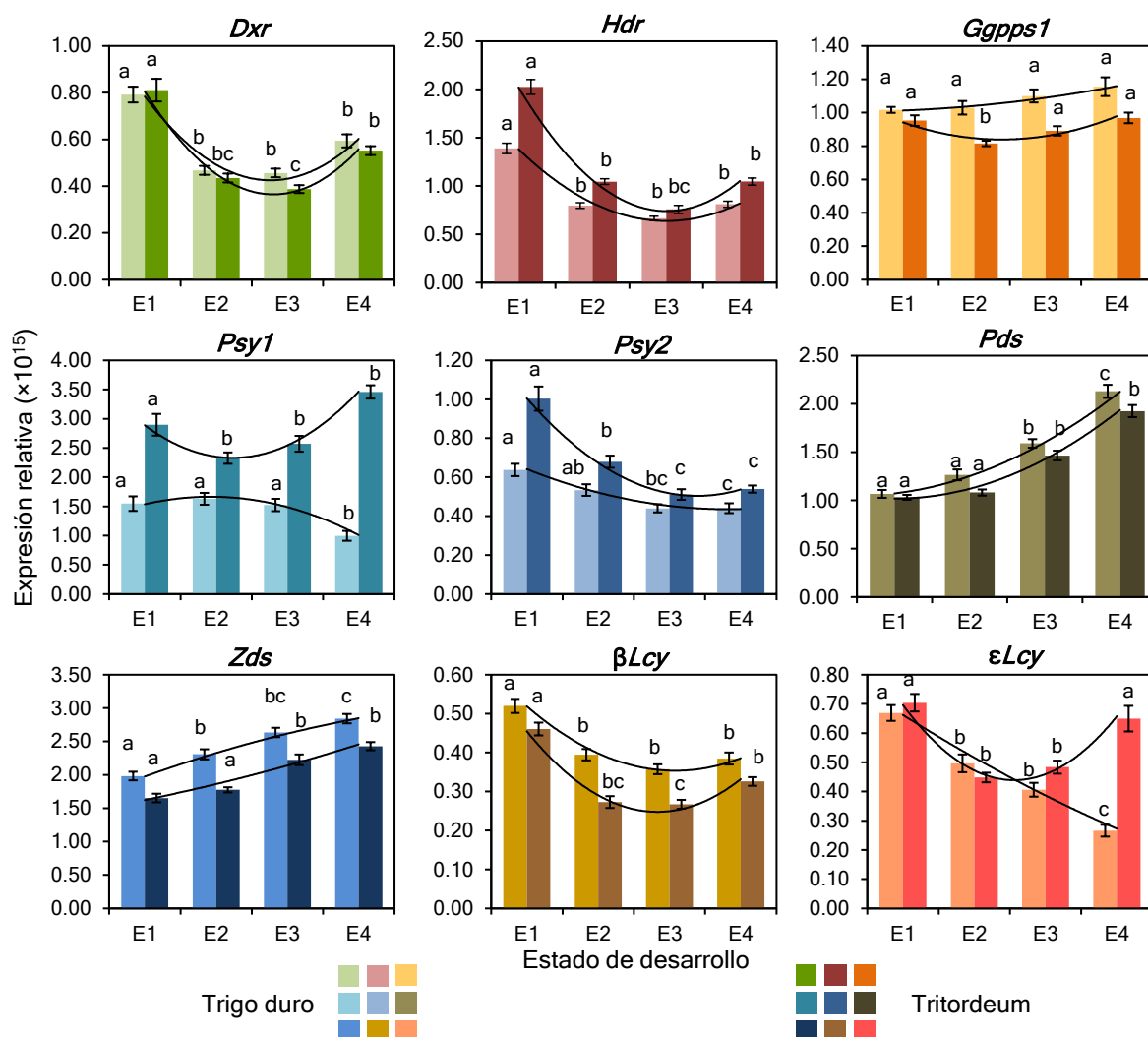


Figura 118. Evolución del perfil de transcritos (expresión génica relativa) de nueve genes (*Dxr*, *Hdr*, *Ggpps1*, *Psy1*, *Psy2*, *Pds*, *Zds*, β LCY y ϵ LCY) pertenecientes a la ruta de los isoprenoides (ruta MEP) y a la ruta de carotenogénesis durante el desarrollo de granos de trigo duro y tritordeum. Los valores mostrados representan la media y el error estándar para cada estadio de desarrollo en el conjunto de cada genotipo estudiado, trigo duro (Don Pedro, Simeto, Claudio, Kofa y UC1113) y tritordeum (HT621, HT630, HT609, HT240 y HT335). Diferentes letras para un mismo gen y especie muestran diferencias significativas (test de Duncan, $p < 0.05$).

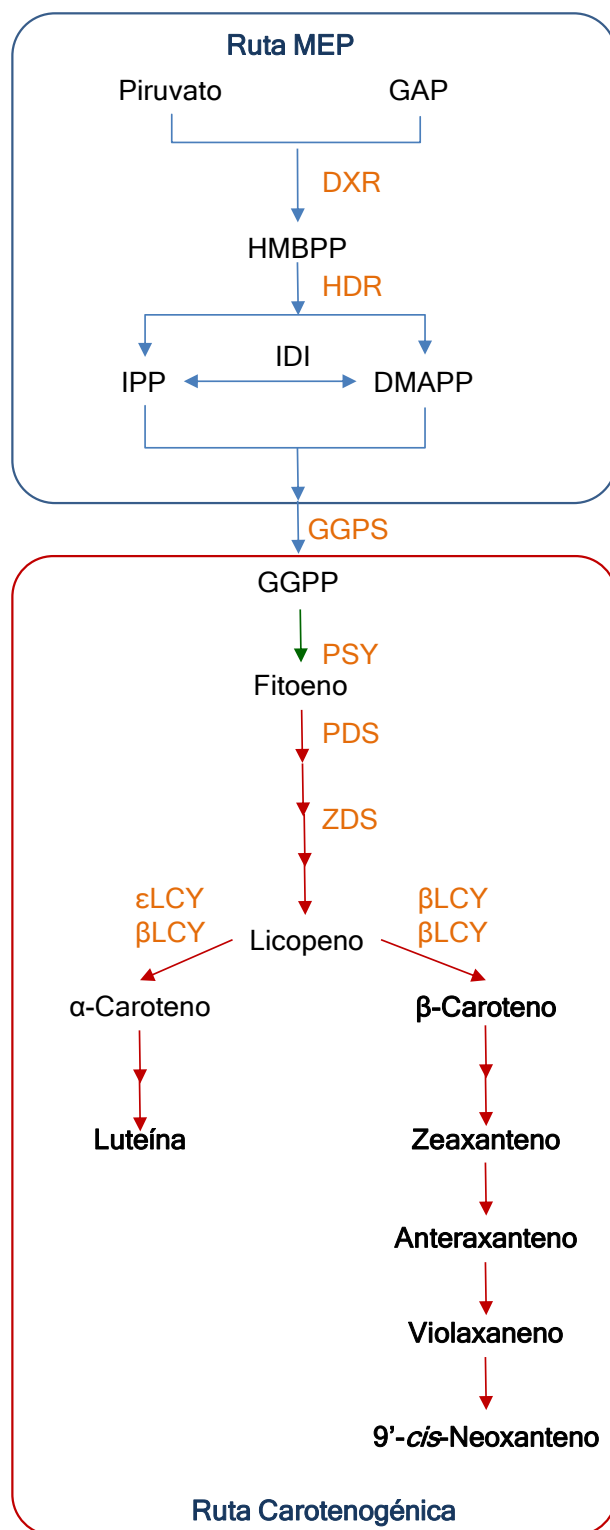


Figura 119. Esquema simplificado de las rutas MEP y carotenogénica de plantas superiores con indicación de las enzimas correspondientes codificadas por los genes estudiados (en color naranja). En negrilla se señalan los pigmentos carotenoides identificados y cuantificados durante el desarrollo de los granos de trigo duro y tritordeum.



Los genes *Dxr* y *Hdr* que codifican para las enzimas implicadas en la generación de precursores de la ruta MEP (Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002) presentaron un perfil de evolución que indica una tendencia caracterizada por presentar un mínimo de expresión situado en el periodo intermedio del desarrollo. Este patrón de expresión, caracterizado especialmente por aumentar al final del desarrollo, ha sido observado previamente en mutantes de *Arabidopsis*, en donde los transcritos de todos los genes de la ruta MEP se encontraron altamente modulados por el estado de desarrollo de la planta (Guevara-García *et al.*, 2005). Así mismo durante la biogénesis de plastos se ha encontrado un patrón temporal de la expresión de *Hdr*, directamente implicado en dicho proceso (Gutiérrez-Nava *et al.*, 2004). Los niveles de transcritos de *Dxr* fueron similares en ambas especies con respecto a un mismo estado de desarrollo, mientras que *Hdr* mostró siempre niveles superiores en tritordeum, especialmente al inicio del desarrollo. El carácter divergente de la ruta MEP, proporcionando precursores para la síntesis de otras moléculas distintas de los carotenoides (clorofilas, giberelinas, esteroides, tocoferoles, etc.) podrían justificar las tendencias observadas en la producción de transcritos en ambos cereales. Ambos genes, *Dxr* y *Hdr*, son considerados como puntos importantes de control de la ruta MEP (Carretero-Paulet *et al.*, 2002; Botella-Pavía *et al.*, 2004). La presencia de niveles superiores de transcritos de *Hdr* en tritordeum podría estar relacionada con su mayor capacidad de producción y acumulación de carotenoides, al producirse un mayor flujo de sustratos para su síntesis. El gen *Hdr* codifica para la enzima hidroximetilbutenil difosfato reductasa (HDR) la cual actúa al final de la ruta MEP generando IPP y DMAPP. Dicho paso no es un punto de bifurcación hacia otras rutas de síntesis de isoprenoides, como sí lo son los catalizados por los productos de los genes *Dxr* y *Ggpps*, en los que por tanto el análisis de transcritos resulta más complejo. Estudios realizados con maíz han demostrado la existencia de correlación positiva entre el nivel de transcritos de *Hdr* durante el desarrollo del endospermo y la acumulación de carotenoides encontrada en el grano maduro (Vallabhaneni y Wurtzel, 2009). No obstante hay que tener en cuenta que la propia ruta parece presentar una regulación postranscripcional (Guevara-García *et al.*, 2005) por lo que el nivel de transcritos no es traducible directamente en actividad enzimática indicando una regulación complicada. Algunos autores, estudiando plántulas de *Arabidopsis* etioladas, indican que tanto HDR como DXS (primera enzima de la ruta MEP) están sujetos a una regulación de retroalimentación (*feedback*), lo que lleva a una acumulación enzimática postranscripcional, iniciada por enzimas importantes de la ruta carotenogénica como la PSY asegurándose así el suministro adecuado de precursores en estadios posteriores (Rodríguez-Villalón *et al.*, 2009a; b).



La evolución de los transcritos para *Ggpps1* presenta algo de disimilitud entre ambos cereales produciéndose solo aumento en la expresión conforme transcurre el desarrollo para trigos. En tritordeum el perfil de expresión guarda semejanza con lo comentado anteriormente para los genes *Dxr* y *Hdr* de la ruta MEP. Para todos los estadios de desarrollo la cantidad de transcrito fue superior en trigo duro lo cual, tal y como se ha indicado, puede venir derivado de una mayor demanda de precursores hacia otras rutas como la síntesis de clorofilas, las cuales estuvieron a niveles más elevados en trigo duro. La mayoría de las revisiones sobre regulación de la ruta de síntesis de carotenoides coinciden en que el suministro de precursores isoprenoides influye de forma significativa en la carotenogénesis (Cunningham, 2002; Sandmann *et al.*, 2006; Cazzonelli y Pogson, 2010), siendo necesaria una correcta regulación de la interconexión entre la ruta MEP y la de carotenogénesis para una producción eficiente de precursores (Lois *et al.*, 2000; Rodríguez-Concepción *et al.*, 2001). La generación de mutantes y análisis de la expresión de transcritos de genes de la ruta MEP y su correlación positiva con el aumento de carotenoides así lo confirman (Estévez *et al.*, 2001; Enfissi *et al.*, 2005; Carretero-Paulet *et al.*, 2006; Vallabhaneni y Wurtzel, 2009).

Los genes *Psy1* y *Psy2* constituyen dos de los tres genes que codifican para la primera enzima de la ruta carotenoide en cereales (Li *et al.*, 2009). La enzima fitoeno sintasa (PSY) está considerada como uno de los puntos principales de control (Cazzonelli y Pogson, 2010; Hannoufa y Hossain, 2012) por lo que el análisis de éstos se encuentra más que justificado en el presente trabajo. La presencia de distintos genes, a diferencia de otras especies vegetales como *Arabidopsis* que solo presenta una forma, denota un mecanismo fino de regulación asociado al tipo de tejido (Gallagher *et al.*, 2004) y que responde a señales medioambientales o de desarrollo (Li *et al.*, 2008a,b; Welsch *et al.*, 2008). El perfil de evolución de la expresión de los genes *Psy1* y *Psy2* fue totalmente diferente en función de la especie y del progreso del desarrollo de los granos. Los cambios observados para la expresión de *Psy2* fueron un paralelismo para ambas especies, presentando una tendencia al descenso a lo largo del periodo de desarrollo. Por el contrario, el perfil de expresión de *Psy1* fue claramente dependiente de la especie de cereal, de tal forma que disminuyó en trigo duro, mientras que en tritordeum la tendencia fue a aumentar a partir del segundo estadio (E2) alcanzando al final (estadio E4) niveles superiores a los registrados al inicio, es decir experimentó un proceso de activación. Estos resultados son consistentes con otros estudios recientes sobre el patrón de expresión del gen *Psy* en cereales donde se muestra un nivel de expresión superior por parte de *Psy1* con respecto a *Psy2* durante el desarrollo de granos de trigos (Dibari *et al.*, 2012). Los trabajos con endospermo de maíz en desarrollo realizados por Li *et al.*, (2008b) exhiben un patrón de expresión concordante con



lo que se obtiene para *Psy1* en tritordeum mostrando aumentos significativos de los transcritos para dicho gen desde los 12 hasta los 22 DDA. Rodríguez-Suárez *et al.*, (2011a) han descrito resultados similares para granos de *H. chilense* (parental de tritordeum) a 18 y 28 DDA. Para ambos genes la cantidad de transcrito fue siempre superior para tritordeum siendo esta diferencia muy llamativa para el caso de *Psy1*. Este dato es relevante ya que de los tres parálogos que codifican para fitoeno sintasa (PSY) solo *Psy1* es el único relacionado con la acumulación y variabilidad del contenido carotenóide encontrado en el endospermo de trigo (Gallagher *et al.*, 2004; Pozniak *et al.*, 2007; Zhang y Dubcovsky, 2008; Singh *et al.*, 2009). Este nivel de transcritos de *Psy1* se encuentra en consonancia con la cantidad de pigmentos que caracterizan a las líneas avanzadas de tritordeum en comparación con las muestras de trigo duro cuando el grano está desarrollado. Algunos autores han sugerido que la copia extra de *Psy1* que porta tritordeum, procedente del genoma de *H. chilense*, podría estar relacionado en este sentido potenciando una mayor síntesis de fitoeno, el primer carotenóide que se forma durante la carotenogénesis. Dicho gen es probablemente muy distinto al portado por los genomas de trigo duro lo cual impide que se generen fenómenos de co-supresión algo que si se ha apuntado que podría ocurrir en trigo harinero para explicar los bajos niveles de pigmentos en éstos (Atienza *et al.*, 2007d).

Con respecto a los genes que codifican para enzimas más posteriores de la ruta la evolución de los datos indica unas tendencias también diferenciables. Los genes *Pds* y *Zds* (que codifican para fitoeno desaturasa (PDS) y ζ -caroteno desaturasa (ZDS), respectivamente) mostraron un patrón de expresión dominado por ascenso en ambos cereales conforme transcurre el desarrollo, siendo los niveles de transcritos siempre superiores para trigo duro. El perfil de expresión obtenido sugiere también una influencia del estado de desarrollo sobre dichos genes manifestando un patrón temporal. Esos datos son contrarios a los mencionados por Li *et al.*, (1996) analizando la expresión de *Pds* en el endospermo durante el desarrollo de maíz, donde se observó un patrón de expresión constitutiva para dicho gen.

La evolución para los genes β LCY y ϵ LCY (que codifican para licopeno β -ciclase (LYCB) y licopeno ϵ -ciclase (LYCE), respectivamente) resultó diferente, a la vez que relevante, debido a que los productos de ambos intervienen en la zona de bifurcación de la ruta, ciclación de licopeno, hacia la producción de carotenoides de las ramas $\beta\beta$ y $\beta\epsilon$ (Cunningham *et al.*, 1996). El gen β LCY presentó un patrón de expresión similar para los dos tipos de muestras en los que se observa una tendencia a disminuir durante los primeros momentos del desarrollo, seguido de una constancia en los niveles hasta el final del proceso, siendo los niveles de transcritos superiores en trigo duro con respecto a

tritordeum. Por el contrario la expresión del gen ϵLCY evidenció diferencia a nivel de especie, con una acusada disminución en trigo duro, mientras que se observó una evidente activación al final del desarrollo para los granos de tritordeum. Estos resultados son consistentes con el hecho de que el pigmento principal en cereales es luteína, y se correlacionan con la presencia de mayores niveles en tritordeum, en especial dado el hecho de que ϵLCY ha sido apuntado como gen regulador de la ruta de carotenogénesis (Pogson *et al.*, 1996; Ronen *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2008). Harjes *et al.*, (2008) estudiando la variabilidad genética existente en poblaciones de maíz encontraron que el gen ϵLCY presenta un papel clave en controlar el ratio de carotenoides totales que se producen por las ramas $\beta\beta$ y $\beta\epsilon$. Algunos alelos ϵLCY caracterizados por su baja expresión correlacionaban con un incremento en los carotenoides $\beta\beta$. A lo largo del periodo analizado y para los dos tipos de muestras los niveles de expresión de ϵLCY resultaron ser superiores a los correspondientes de βLCY , siendo una excepción el estadio E4 de trigo duro, lo cual se correlaciona directamente con una mayor potenciación de la biosíntesis de carotenoides de la rama $\beta\epsilon$ en tritordeum, en especial de luteína. Esto es también consistente con los análisis realizados por algunos autores en los que se advierte en el endospermo una expresión preferencial de ϵLCY frente a la de βLCY , patrón que se invierte en el embrión, implicando una posible regulación de la carotenogénesis mediante una expresión diferencial en los diferentes tejidos del grano (Bai *et al.*, 2009).

Los análisis de expresión de genes carotenogénicos realizados en el presente estudio indican la existencia de un patrón temporal de expresión modulable por el estadio de desarrollo del grano, no detectándose patrones de expresión constitutiva o constante a lo largo del periodo contemplado. El resultado más destacable sería el incremento para la expresión de los genes *Psy1* y ϵLCY conforme avanzó el proceso de desarrollo de los granos de tritordeum, lo cual se correlaciona con la mayor capacidad de síntesis y acumulación de pigmentos carotenoides en esta especie y en contraposición a lo observado para trigo duro.



5.7. Evolución del contenido y composición de pigmentos carotenoides durante el almacenamiento en postcosecha de granos maduros de trigo duro y tritordeum.

Las semillas o granos de cereal, como cualquier organismo vivo, están sujetas a experimentar procesos de maduración, envejecimiento y deterioro, observándose diferencias de longevidad entre especies y dentro de una misma especie atribuida a diferencias genotípicas, de origen y ambientales. Dentro de este último aspecto, se engloba las condiciones climáticas durante la maduración de las semillas y de cosecha, así como las condiciones de almacenamiento (Pinzino, 1999), conteniendo estas últimas a los factores más críticos (humedad relativa, presión parcial de oxígeno, temperatura y tiempo). Las semillas pierden viabilidad durante periodos de almacenamiento prolongados, cobrando importancia en dicho proceso la humedad relativa del aire y la temperatura, acelerando en general las reacciones degradativas (Galleschi *et al.*, 2002).

En el presente apartado, se ha analizado la evolución de los pigmentos carotenoides presentes en granos de trigo duro y tritordeum almacenados inmediatamente después de la recolección (periodo de postcosecha) durante un intervalo de tiempo de tres meses a diferentes temperaturas (4, 20 y 37°C), con el objetivo de valorar la incidencia de tales condiciones sobre el contenido y composición de pigmentos, prestando una atención especial en el seguimiento de la esterificación de las xantofilas (especialmente luteína), y la posible participación de este fenómeno en la estabilidad de las mismas. Para tal fin, se seleccionaron granos de las mismas variedades de trigo duro (Don Pedro, Simeto y Claudio) y tritordeum (HT630, HT621 y HT609) con las que se ha realizado el estudio de caracterización de composición de pigmentos. Como se demostró en el apartado anterior, los cambios experimentados en el perfil de carotenoides de las semillas de tritordeum evidencian que el proceso de carotenogénesis debe seguir activo con posterioridad a la maduración del grano. La temperatura, junto con el oxígeno y la luz, son los factores que más influyen en el metabolismo de los pigmentos carotenoides durante el almacenamiento de frutos y vegetales (Britton y Hornero-Méndez, 1997; Mínguez Mosquera, *et al.*, 1997), modulando el balance entre los procesos de biosíntesis y catabolismo.

En la **Figura 120** se puede observar, que en términos generales, la evolución del contenido de carotenoides totales siguió un patrón generalizado en todas las muestras, observándose una disminución de éstos con el tiempo, con salvedades que se comentarán para los trigos. La **Tabla A13** del *Anexo* incluye los valores medios y error estándar, junto con el análisis de significación estadística (test Duncan, $p < 0.05$) de la evolución del contenido total carotenóide para cada especie de cereal (trigo duro y tritordeum). Dicha disminución en los niveles de carotenoides resultó ser más acusada con el aumento de la

temperatura, por lo que los valores más bajos de concentración se registraron para las muestras almacenadas a 37°C, observándose un descenso en torno al 30% para las variedades de trigo duro y del 24% para las de tritordeum al final del periodo de almacenamiento en postcosecha. Estos datos muestran una diferencia importante en cuanto a la evolución de las pérdidas de pigmentos en ambos tipos de cereales y que puede ser atribuido, como se discutirá más adelante, al perfil de esterificación que presenta tritordeum. Para las muestras almacenadas a 4 y 20°C, los cambios con respecto al tiempo resultaron ser más suaves, algo que se observó de forma más significativa en las líneas de tritordeum, demostrando también que éstos últimos presentaron una mayor estabilidad frente a los cambios de temperaturas, o que al menos el balance anabólico/catabólico estuvo más desplazado hacia los procesos de biosíntesis de pigmentos. La **Figura 121** describe la evolución de los perfiles cromatográficos obtenidos para granos de tritordeum (HT621) y trigo duro (Don Pedro) durante el almacenamiento en postrecolección.

En el caso de los trigos duros se observaron aumentos para el contenido carotenoides a las temperaturas de 4 y 20°C en el periodo de tiempo comprendido entre el inicio del experimento y la primera toma de muestra (M1; 30 días). Este fenómeno podría estar relacionado con la existencia de un proceso de maduración de los granos de trigo duro más retardada con respecto a tritordeum, y que estando directamente inducida por las bajas temperaturas, seguiría activo durante el periodo de almacenamiento en postcosecha, compensándose las pérdidas producidas por degradación durante las primeras semanas de almacenamiento. De esta forma, se observaron aumentos en el contenido carotenoides cercanos al 65% para la variedad Claudio y al 31% para Simeto. Este período de adaptación a las nuevas condiciones de almacenamiento, especialmente en los granos conservados a 4 y 37°C (las temperaturas que más difieren de las de cosecha), sugiere la activación metabólica o rotura de la dormancia de los granos, proceso durante el cual se tiene constancia de que aumenta de forma general el contenido de antioxidantes (Howitt y Pogson, 2006). Los carotenoides ejercen un papel protector frente a la acción de los radicales libres y previenen el envejecimiento de las semillas, contribuyendo en este caso al éxito de la germinación de éstas. Diversos estudios han demostrado una relación directa entre el contenido de antioxidantes, incluidos los carotenoides, y el envejecimiento o estado vegetativo de las semillas (Pinzino, 1999; Galleschi *et al.*, 2002).

En las **Figuras 122, 123 y 124** se muestra la evolución de los pigmentos carotenoides individuales presentes en los granos de las variedades de trigo duro estudiadas. Las **Tablas A14 -A16** del *Anexo* incluye los valores medios y error estándar, junto con el análisis de significación estadística (test Duncan, $p < 0.05$). El comportamiento de las tres variedades resultó concordante con la evolución del contenido carotenoides total.



De forma general, a 4°C se observó para todos los pigmentos el aumento anteriormente observado para el contenido carotenoides total, siendo en este caso, la variedad Claudio la que registró los mayores aumentos en todos los pigmentos durante el periodo de adaptación (30 días). Igualmente el descenso en concentración de los pigmentos resultó ser más acusado a 37°C, y en particular al final del periodo de almacenamiento (90 días), siendo para all-*trans*-luteína del orden del 37% en las variedades Don Pedro y Simeto respectivamente, y del 25% para la variedad Claudio. Con respecto a all-*trans*-zeaxanteno, éste experimentó un descenso del orden del 23% en las variedades Don Pedro y Simeto, y del 12% en Claudio. La fracción de carotenoides minoritarios, como los isómeros *cis* de luteína, experimentaron en las tres variedades unos descensos menores que para los demás pigmentos, dato que es consistente con el hecho de que durante el almacenamiento de frutos y vegetales uno de los cambios que ocurren con frecuencia es la isomerización de las formas *trans* en *cis*, compensando en cierta forma las pérdidas netas por degradación.

Para las muestras de tritordeum, los cambios más significativos se observaron en el contenido de luteína libre (incluye all-*trans*-luteína, 9-*cis*-luteína y 13-*cis*-luteína) y en las formas esterificadas. En las **Figuras 125, 126 y 127** se muestran las evoluciones de los distintos carotenoides individuales presentes en las líneas de tritordeum. Las **Tablas A17 - A19** del *Anexo* incluye los valores medios y el error estándar, junto con el análisis de significación estadística (test Duncan, $p < 0.05$). En términos cuantitativos, todas las líneas de tritordeum experimentaron un aumento en las fracciones de monoésteres y diésteres de luteína con el consiguiente descenso en los niveles de luteína libre. Este aspecto se observa claramente en la **Figura 128**, la cual muestra las variaciones en las fracciones de luteína libre y esterificada en términos relativos (porcentuales). Resulta significativo el descenso de los niveles de all-*trans*-luteína a la temperatura de 37°C en un rango de 40-60% con respecto a los niveles observados a 4° y 20°C. No obstante, dicho descenso estuvo acompañado de un aumento de las fracciones de luteína esterificadas. Para ambas fracciones, monoésteres y diésteres, el incremento más acusado se produjo a 37°C, lo que sugiere un efecto positivo y modulador de la temperatura sobre el proceso de esterificación de xantofilas. En general, la fracción de diésteres experimentó aumentos superiores que la fracción monoesterificada, siendo 6.99, 9.87 y 9.31 veces superior con respecto a los valores iniciales para HT630, HT621 y HT609 al final del periodo de almacenamiento a 37°C, mientras que la fracción monoesterificada incrementó su concentración en 1.58, 2.33 y 2.09 veces, respectivamente. Nuevamente se observó un progreso más amortiguado para la fracción de isómeros *cis* de luteína, lo cual corrobora la existencia de una pequeña tasa de isomerización de *trans* a *cis* que compensa la degradación neta. Finalmente, mencionar que β -caroteno mostró en general una tendencia a la degradación, aunque su presencia a

niveles de traza dificultó su cuantificación y por lo tanto la evaluación adecuada de su comportamiento (**Figuras 125, 126 y 127**).

Los resultados obtenidos concuerdan con estudios anteriores (Kaneko *et al.*, 1995; Kaneko y Oyanagi, 1995) en los que también se pone de manifiesto la esterificación de luteína en cereales, aunque estos autores lo observan en trigos (distintos a las variedades aquí estudiadas), lo que implica que la esterificación está altamente influenciada y regulada por el genoma del trigo, siendo éste un factor importante a estudiar. El aumento progresivo en la esterificación de luteína, activado en una situación de estrés como es el aumento de la temperatura, es un mecanismo que confiere una mayor estabilidad a luteína, algo que se deduce de los menores valores de pérdidas respecto al contenido de carotenoides totales en tritordeum frente al de los trigos. La esterificación aumenta el carácter apolar de estas moléculas, facilitando su almacenamiento en estructuras de membrana o cuerpos lipofílicos que posibilitan una mayor protección frente a sistemas enzimáticos degradativos. Esta estabilidad resulta importante para conservar unos niveles óptimos de dicho carotenoide en tritordeum y ayuda a optimizar su uso como cereal funcional, mostrando una mayor adaptabilidad a las condiciones de almacenamiento a las que se someten los cereales.

5.7.1. Evolución y estabilidad de las fracciones de luteína esterificada durante el almacenamiento en postcosecha de granos de tritordeum a distintas temperaturas.

En base a lo anterior, resulta de interés analizar más en detalle la evolución de las distintas formas esterificadas de luteína en las líneas de tritordeum. En la **Figuras 129, 130 y 131** se muestran las correspondientes gráficas para los distintos monoésteres y diésteres identificados, sin distinguir los correspondientes estereoisómeros. En términos generales, y de una manera consistente con los resultados anteriormente expuestos, la evolución de las formas esterificadas de luteína a las distintas temperaturas cursa con un aumento progresivo, observándose para todos los casos un incremento muy acusado a 37°C al término del periodo de almacenamiento (90 días).

De forma generalizada, se observa un mayor contenido de luteína monopalmitato que de luteína monolinoleato, del orden de 1.4 y 1.3 veces para HT621 y HT609, respectivamente, y de 1.6 veces para HT630. Estos datos sugieren nuevamente una mayor afinidad de los sistemas enzimáticos que llevan a cabo la esterificación por el ácido palmítico que por el ácido linoleico, siendo este último el más abundante en las semillas analizadas (ver apartado 5.3). Como ya se ha mencionado, estos resultados indican la alta selectividad del proceso de esterificación de xantofilas. Otro factor a tener en cuenta y que puede estar influyendo en los niveles encontrados de monoésteres son las reacciones de



peroxidación lipídica, que pudieran aumentar con la evolución del periodo de almacenamiento (Hildebrand, 1989). En este sentido, los ácidos grasos poliinsaturados como en este caso el ácido linoleico, son más susceptibles a la oxidación que los saturados como el palmítico. Las Figuras 132, 133 y 134 muestran el progreso de los niveles de los dos regioisómeros correspondientes a los monoésteres de luteína en las posiciones 3 y 3' con ácido palmítico (luteína-3-*O*-palmitato y luteína-3'-*O*-palmitato) y linoléico (luteína-3-*O*-linoleato y luteína-3'-*O*-linoleato), respectivamente. Llama especialmente la atención que con independencia de la variedad de tritordeum, el perfil de evolución de los dos regioisómeros para un determinado monoéster (monopalmitato o monolinoleato) fue similar a lo largo del periodo de almacenamiento, lo cual indicaría que la afinidad de las enzimas XAT involucradas en la esterificación no se ve modificada por la temperatura en lo que respecta a la posición preferente de esterificación en la molécula de luteína (posición 3 del anillo β). Este hecho se constata en la **Tabla 22**, donde se recogen las relaciones entre los regioisómeros (ratio 3/3') en función del tiempo de almacenamiento y la temperatura, observándose una constancia en los valores de los ratios 3/3' para cada monoéster. Aunque, se observó una tendencia a una ligera reducción de los valores de 3/3' conforme aumentó la temperatura y el tiempo de almacenamiento. Estos datos están en consonancia con los mostrados con anterioridad en el apartado de caracterización. Así, la relación media entre los monoésteres en la posición 3 con respecto a la posición 3' alcanzó valores de 4.3 y 2.2 para luteína monolinoleato y luteína monopalmitato, respectivamente. Esto indicaría, que si bien los ésteres con ácido palmítico son siempre mayoritarios con respecto a los ésteres con ácido linoleico, la diferencia entre la afinidad por la posición 3 y 3' de luteína es más acusada en los monoésteres con éste último ácido graso.

Con respecto a la fracción de diésteres, luteína dipalmitato resultó ser el diéster más abundante en todas las líneas de tritordeum, seguido del heterodiesté luteína linoleatopalmitato, encontrándose el tercer diéster, luteína dilinoleato, en cantidades trazas, lo cual es concordante con la especificidad por el ácido palmítico que anteriormente se ha indicado y con el efecto de la oxidación de los dobles enlaces en el ácido linoleico que se deriva en una menor estabilidad. Los aumentos observados al final del periodo de almacenamiento (37°C y 90 días) fueron muy acusados (**Figuras 129, 130 y 131**), siendo para luteína dipalmitato del orden de dos veces en las líneas HT621 y HT609, y de una vez para HT630, en comparación con lo acontecido a 20°C. Los aumentos registrados para luteína linoleatopalmitato y luteína dilinoleato fueron más patentes para las líneas HT621 y HT609, mostrando incrementos de hasta cuatro veces en el contenido de luteína dilinoleato. Estos datos indican nuevamente que los procesos metabólicos relacionados con la síntesis de xantofilas esterificadas se inducen por acción de la temperatura en tritordeum.

Tabla 22. Valores de la relación entre regioisómeros (ratio 3/3') de luteína monopalmitato y monolinoleato durante el almacenamiento en postcosecha de granos maduros de tritordeum (HT630, HT621 y HT609).

Tritordeum	Tiempo (días)	Ratio 3/3' regioisómeros Luteína monolinoleato			Ratio 3/3' regioisómeros Luteína monopalmitato		
		4°C	20°C	37°C	4°C	20°C	37°C
HT630	Control	4.5	4.5	4.5	2.3	2.3	2.3
	30	4.7	4.6	4.6	2.3	2.3	2.2
	60	4.7	4.7	4.3	2.3	2.2	2.2
	90	4.9	4.7	4.2	2.2	2.2	2.2
HT621	Control	3.8	3.8	3.8	2.3	2.3	2.3
	30	4.0	3.9	3.8	2.3	2.2	2.0
	60	4.1	4.0	3.6	2.2	2.1	1.9
	90	4.1	4.0	3.7	2.1	2.0	1.9
HT609	Control	4.0	4.0	4.0	2.4	2.4	2.4
	30	4.1	4.0	4.2	2.4	2.3	2.3
	60	4.1	4.1	4.0	2.3	2.3	2.2
	90	4.2	4.2	3.9	2.3	2.2	2.1

Al objeto de comprobar si la biosíntesis de los ésteres de luteína estuvo asociada con cambios en la composición de ácidos grasos, éstos se determinaron en todas las muestras de trigo duro y tritordeum a lo largo del periodo de almacenamiento. En la **Figura 135** se muestra el comportamiento que siguió el contenido total en ácidos grasos durante el almacenamiento a 4, 20 y 37°C, no observándose diferencias significativas entre ambos tipos de cereales. Cabe señalar, no obstante, el efecto de la temperatura sobre el contenido en ácidos grasos, observándose en todos los casos una tendencia al aumento de concentración conforme se incrementó la temperatura de almacenamiento, lo cual también coincide con el efecto observado sobre la síntesis de xantofilas esterificadas en tritordeum. De forma análoga, cuando se analizó la evolución del contenido de los ácidos grasos responsables de la esterificación de luteína en tritordeum, ácidos palmítico y linoleico, no se detectaron cambios que pudieran indicar variaciones en los mismos que difieran del resto de ácidos grasos (**Figura 136**). Evidentemente, al haber analizado el perfil de ácidos grasos totales resultará difícil encontrar variaciones significativas en ambos ácidos grasos que pudieran atribuirse a los cambios observados para las xantofilas esterificadas, siendo esto solo posible en caso de haber analizado las moléculas que actúan como donadoras de los ácidos grasos en el proceso de esterificación. Como ya se ha discutido con anterioridad, la



naturaleza de dichas moléculas donadoras es desconocidas hasta la fecha, aunque algunas evidencias apuntan a la participación de los MGDG y DGDG.

En cualquier caso, a la vista de los resultados podemos afirmar que aunque no ocurre una síntesis acusada de ácidos grasos tampoco tiene lugar una degradación evidente de los mismos por concurso de enzimas degradativas (Clayton y Morrison, 1972), por lo que debe existir una redistribución y movilización de los ácidos grasos desde las moléculas donadoras hasta las xantofilas, proceso que se activa durante la maduración de las semillas de tritordeum, y continúa operativo a lo largo del periodo de almacenamiento de los granos, coincidiendo con la dormancia de las semillas. En relación a este último aspecto queda por esclarecer el papel del proceso de esterificación en este contexto.

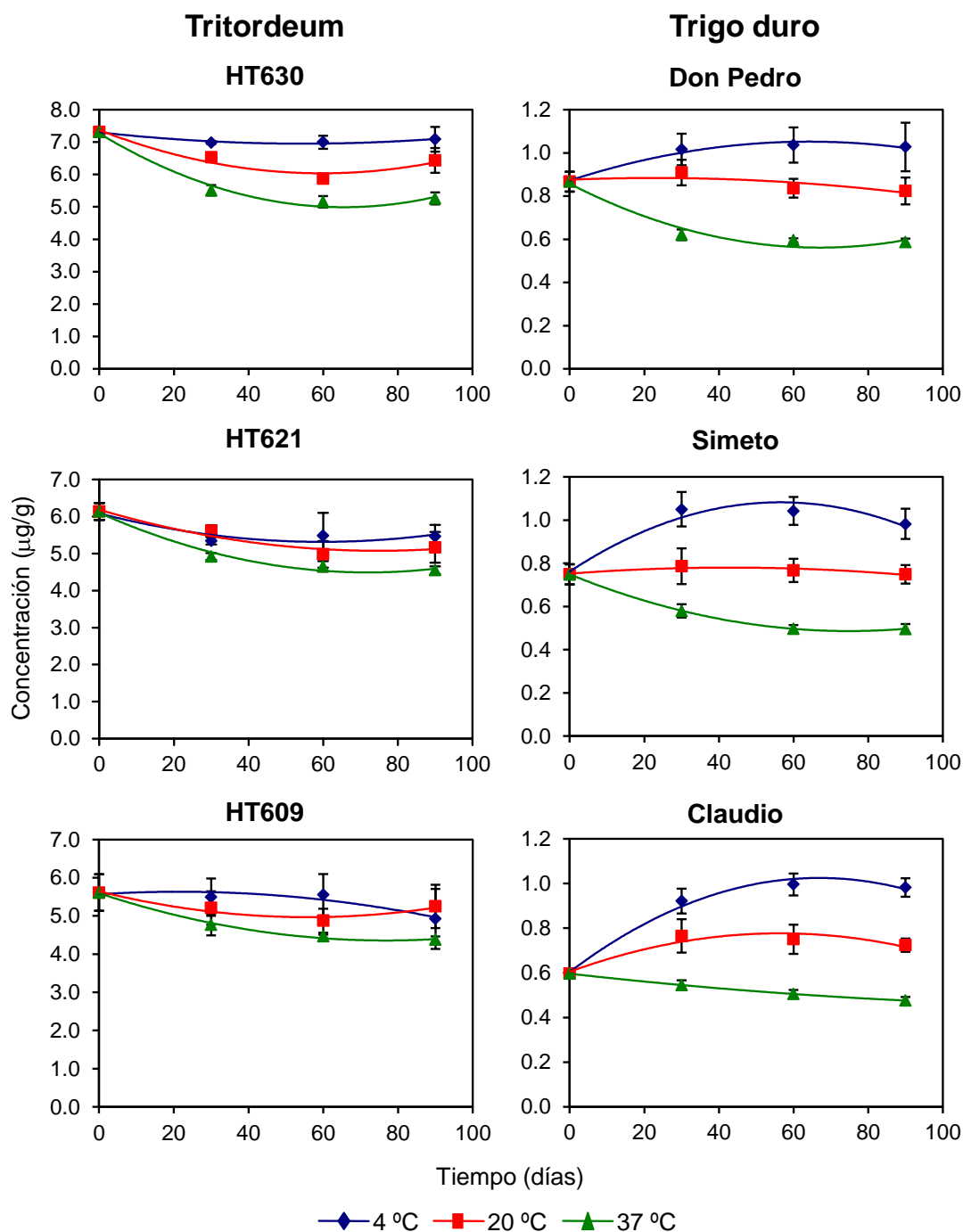
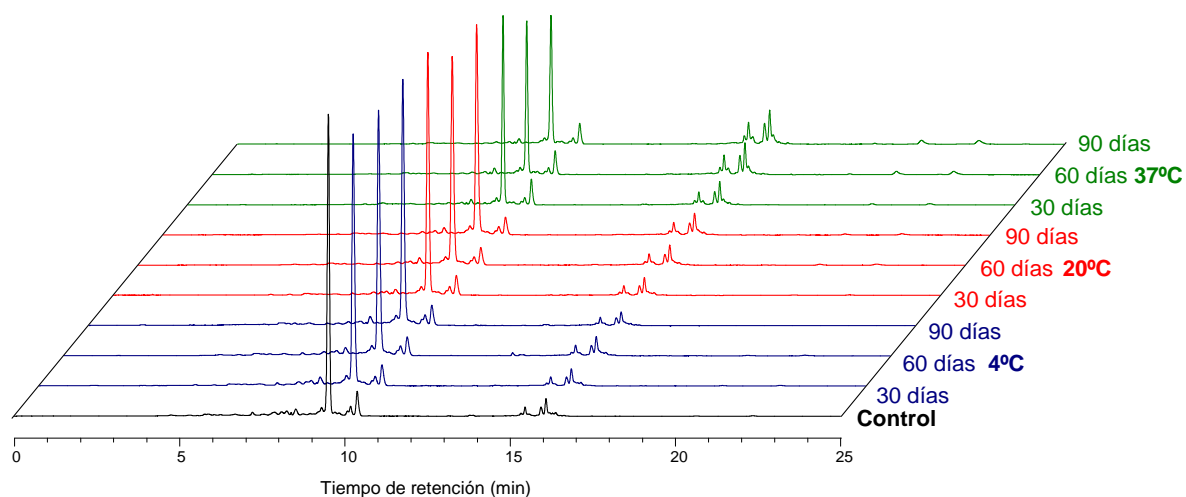


Figura 120. Evolución del contenido carotenoides total (µg/g) presente en las variedades de trigo (Don Pedro, Simeto y Claudio) y en las líneas avanzadas de tritordeum (HT630, HT621 y HT609), durante el almacenamiento de las semillas a 4, 20 y 37°C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de seis análisis (n=6; tres bloques x 2 determinaciones).

Tritordeum (HT621)



Trigo duro (Don Pedro)

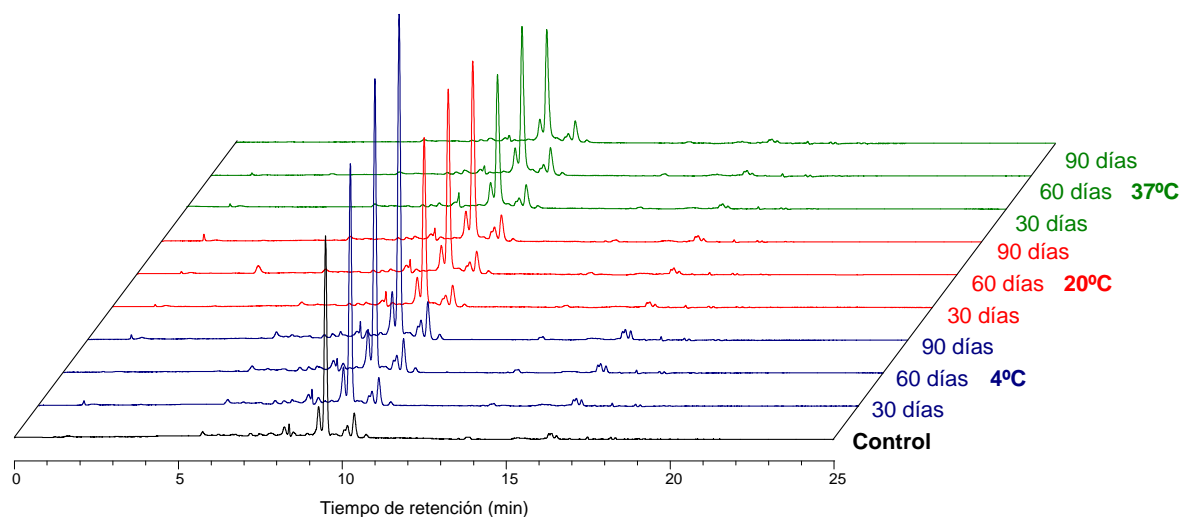


Figura 121. Evolución del perfil cromatográfico de pigmentos carotenoides presentes en granos de tritordeum (HT621) y trigo duro (Don Pedro) durante el almacenamiento en postrecolección a 4, 20 y 37°C.

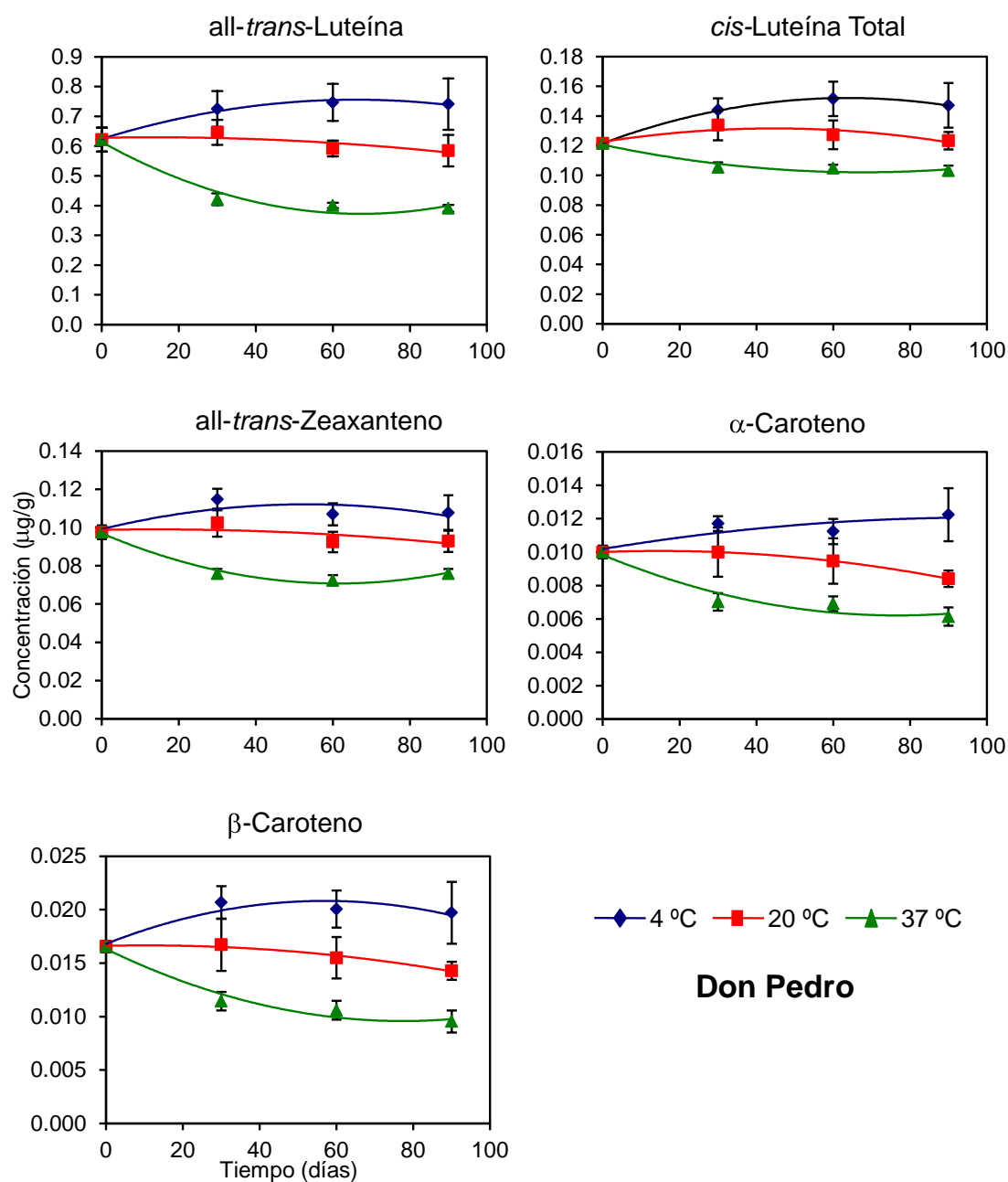


Figura 122. Evolución del contenido (μg/g) en carotenoides individuales (*all-trans*-zeaxanteno, *all-trans*-luteína, *cis*-luteína, α-caroteno y β-caroteno) presentes en los granos de la variedad Don Pedro de trigo duro, durante el almacenamiento de las semillas a 4, 20 y 37°C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de seis análisis (n=6; tres bloques x 2 determinaciones).

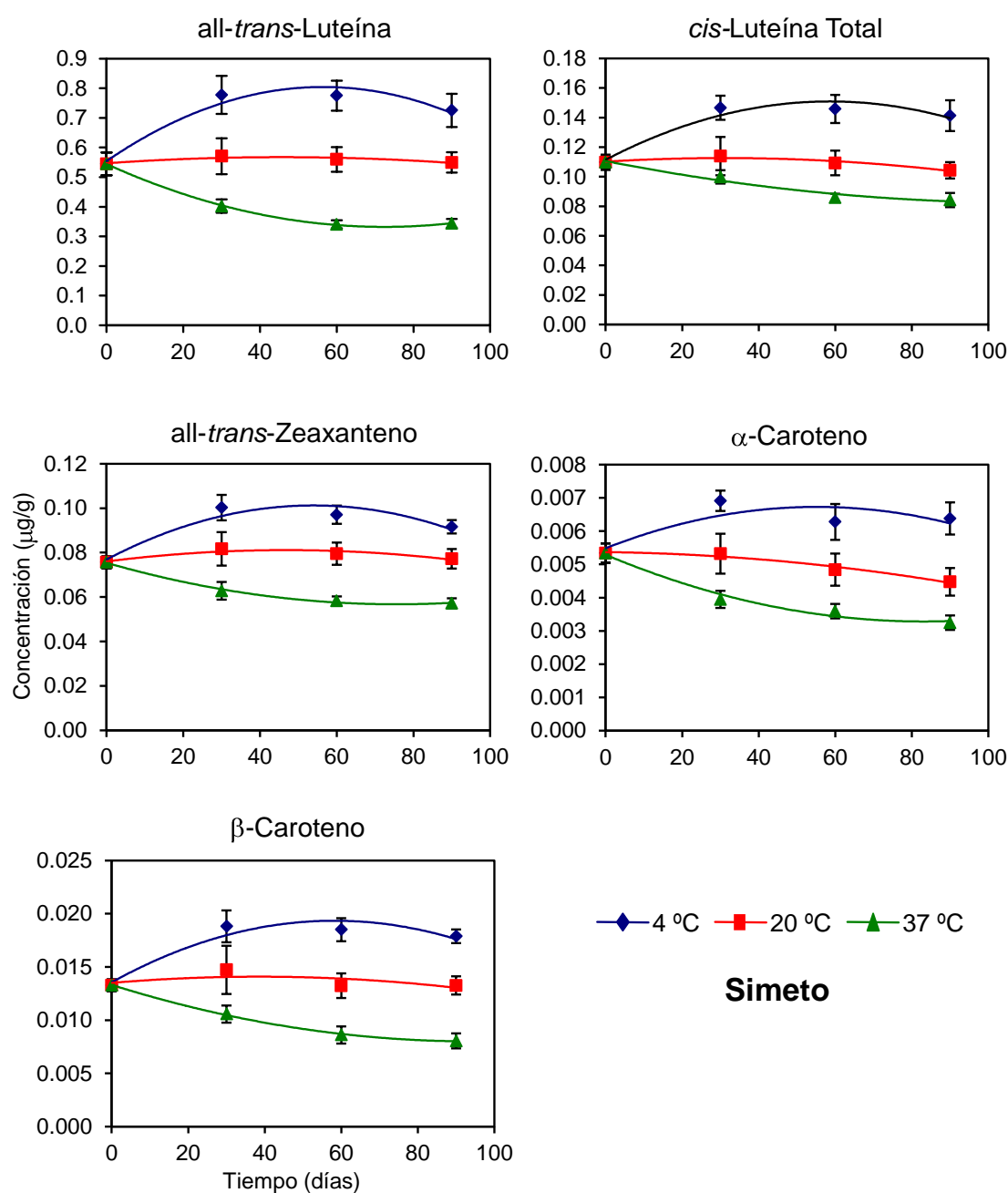


Figura 123. Evolución del contenido (µg/g) en carotenoides individuales (*all-trans*-zeaxanteno, *all-trans*-luteína, *cis*-luteína, α -caroteno y β -caroteno) presentes en los granos de la variedad Simeto de trigo duro, durante el almacenamiento de las semillas a 4, 20 y 37°C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de seis análisis (n=6; tres bloques x 2 determinaciones).

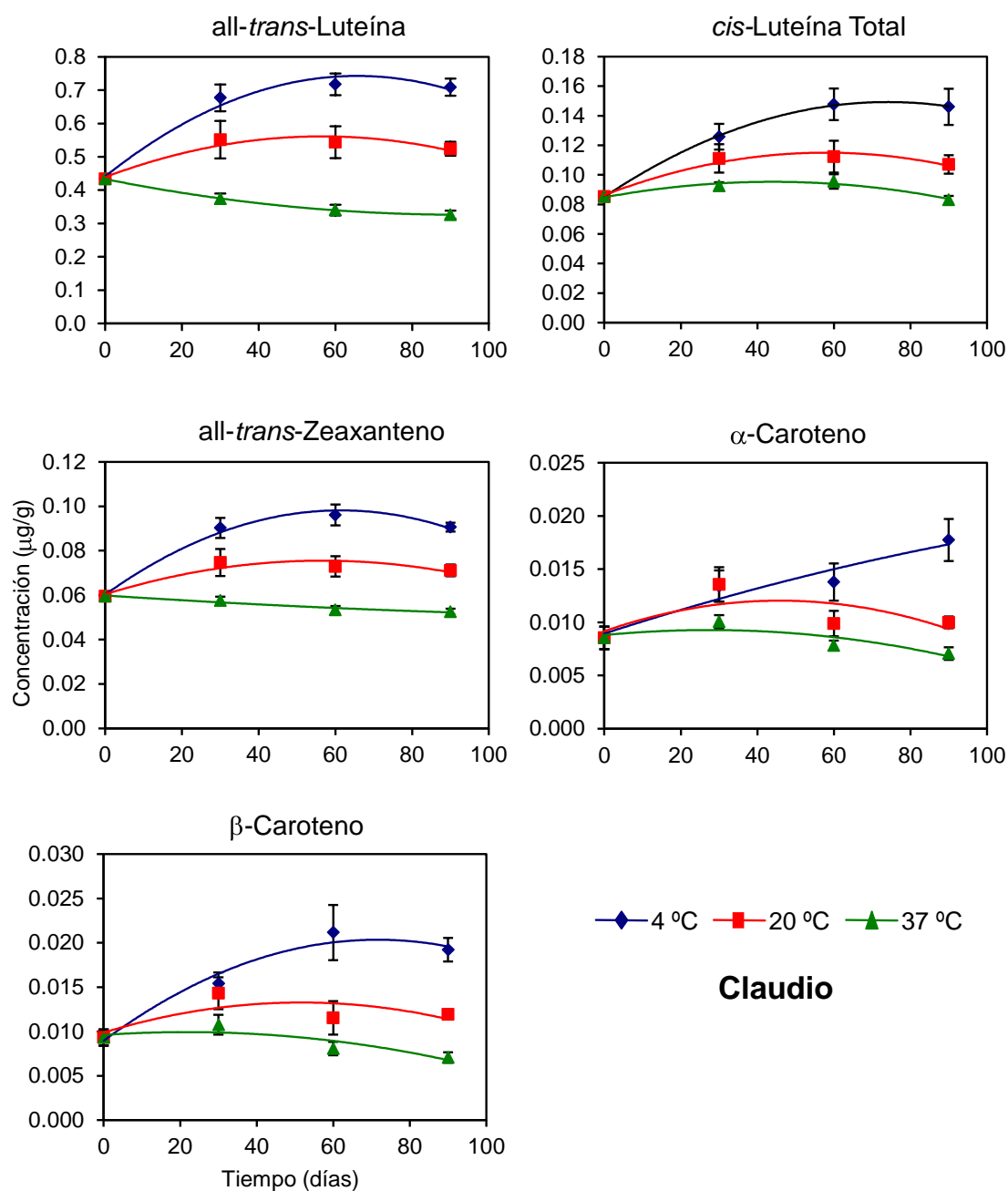
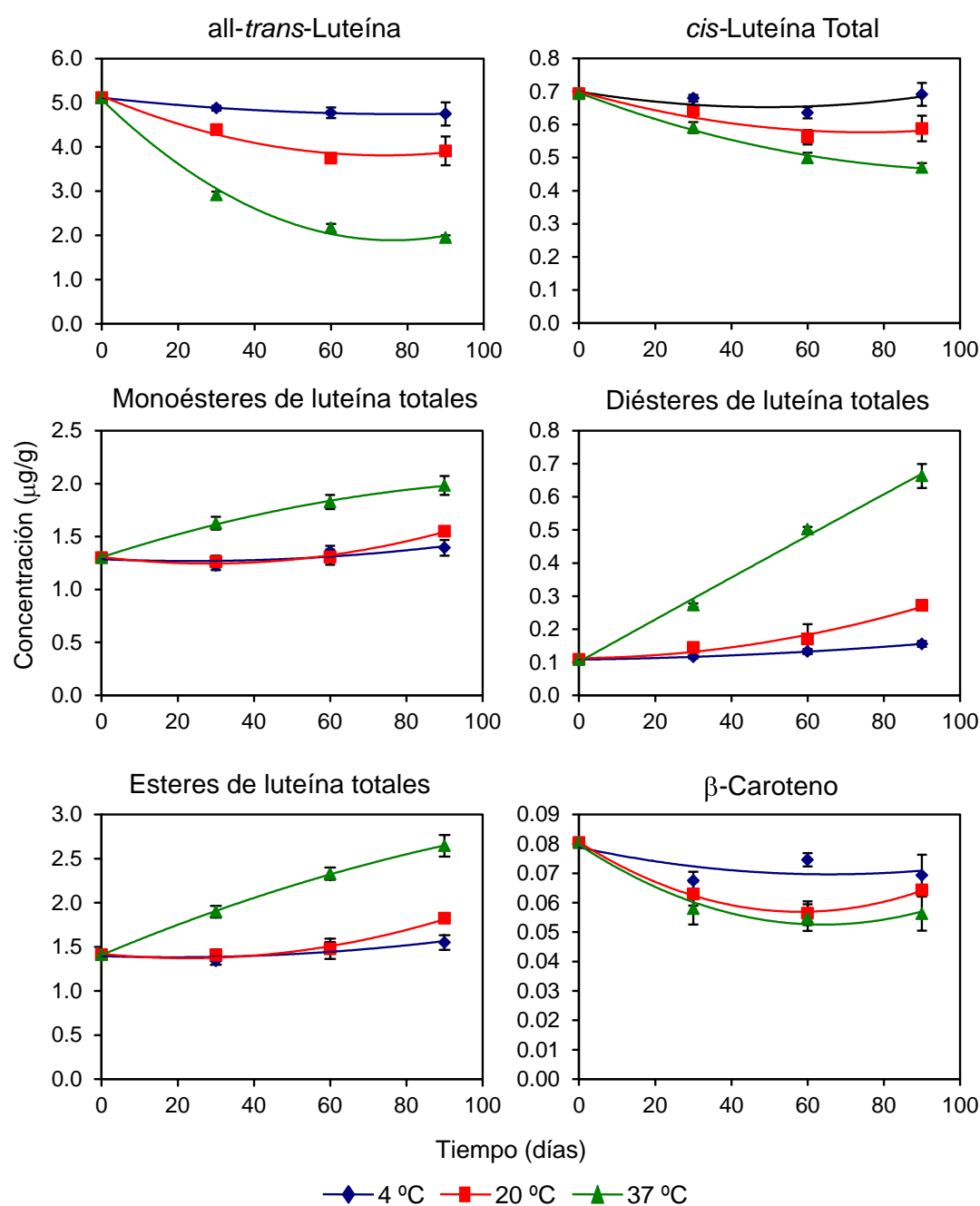
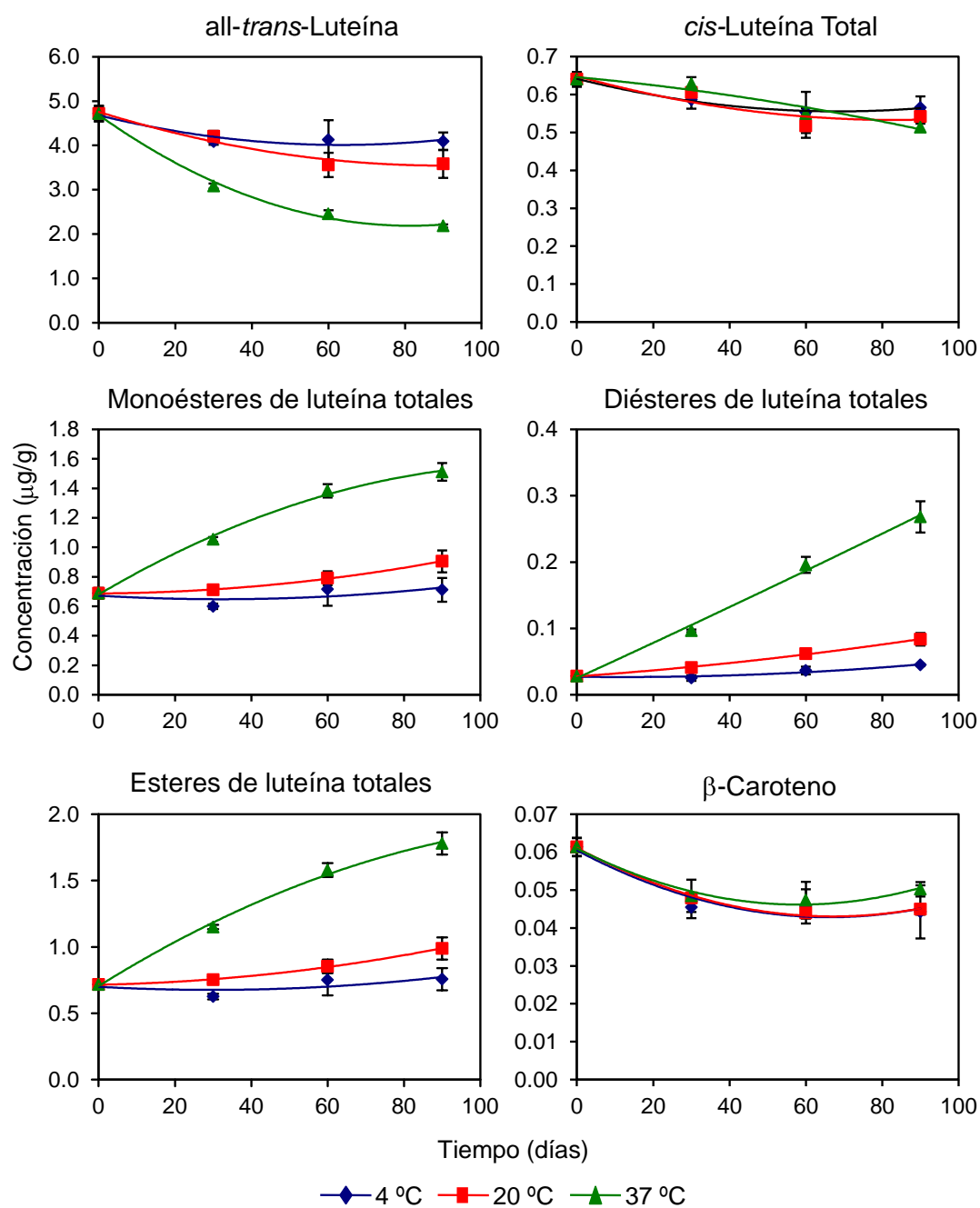


Figura 124. Evolución del contenido (µg/g) en carotenoides individuales (*all-trans*-zeaxanteno, *all-trans*-luteína, *cis*-luteína, α-caroteno y β-caroteno) presentes en los granos de la variedad Claudio de trigo duro, durante el almacenamiento de las semillas a 4, 20 y 37°C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de seis análisis (n=6; tres bloques x 2 determinaciones).



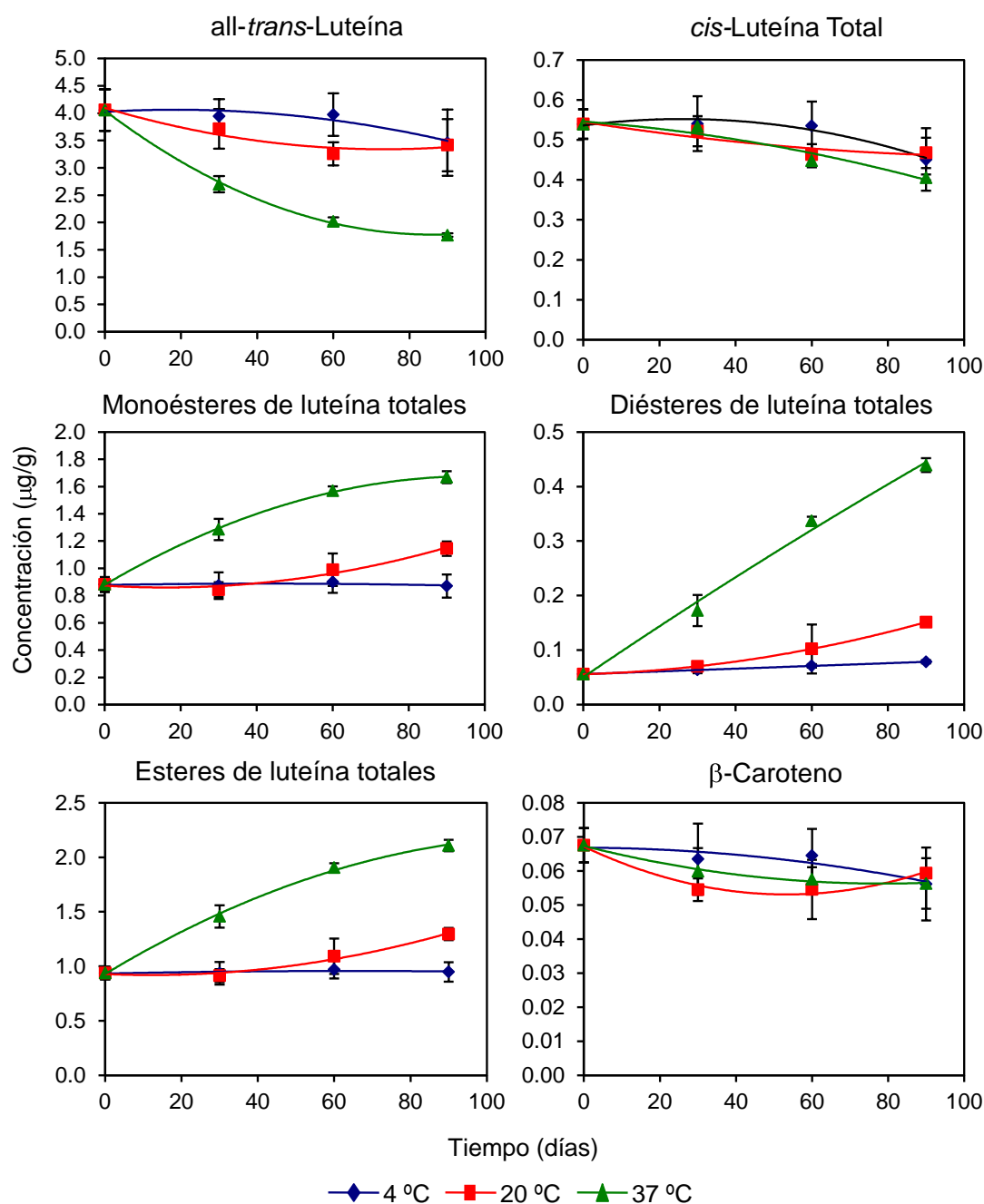
HT630

Figura 125. Evolución del contenido (μg/g) en carotenoides individuales (*all-trans*-luteína, *cis*-luteína y β-caroteno) y fracciones esterificadas de luteína (monoésteres, diésteres y ésteres totales) presentes en los granos de la línea HT630 de tritordeum, durante el almacenamiento de las semillas a 4, 20 y 37°C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de seis análisis (n=6; tres bloques x 2 determinaciones).



HT621

Figura 126. Evolución del contenido (μg/g) en carotenoides individuales (*all-trans*-luteína, *cis*-luteína y β-caroteno) y fracciones esterificadas de luteína (monoésteres, diésteres y ésteres totales) presentes en los granos de la línea HT621 de tritordeum, durante el almacenamiento de las semillas a 4, 20 y 37°C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de seis análisis (n=6; tres bloques x 2 determinaciones).



HT609

Figura 127. Evolución del contenido (μg/g) en carotenoides individuales (*all-trans*-luteína, *cis*-luteína y β-caroteno) y fracciones esterificadas de luteína (monoésteres, diésteres y ésteres totales) presentes en los granos de la línea HT609 de tritordeum, durante el almacenamiento de las semillas a 4, 20 y 37°C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de seis análisis (n=6; tres bloques x 2 determinaciones).

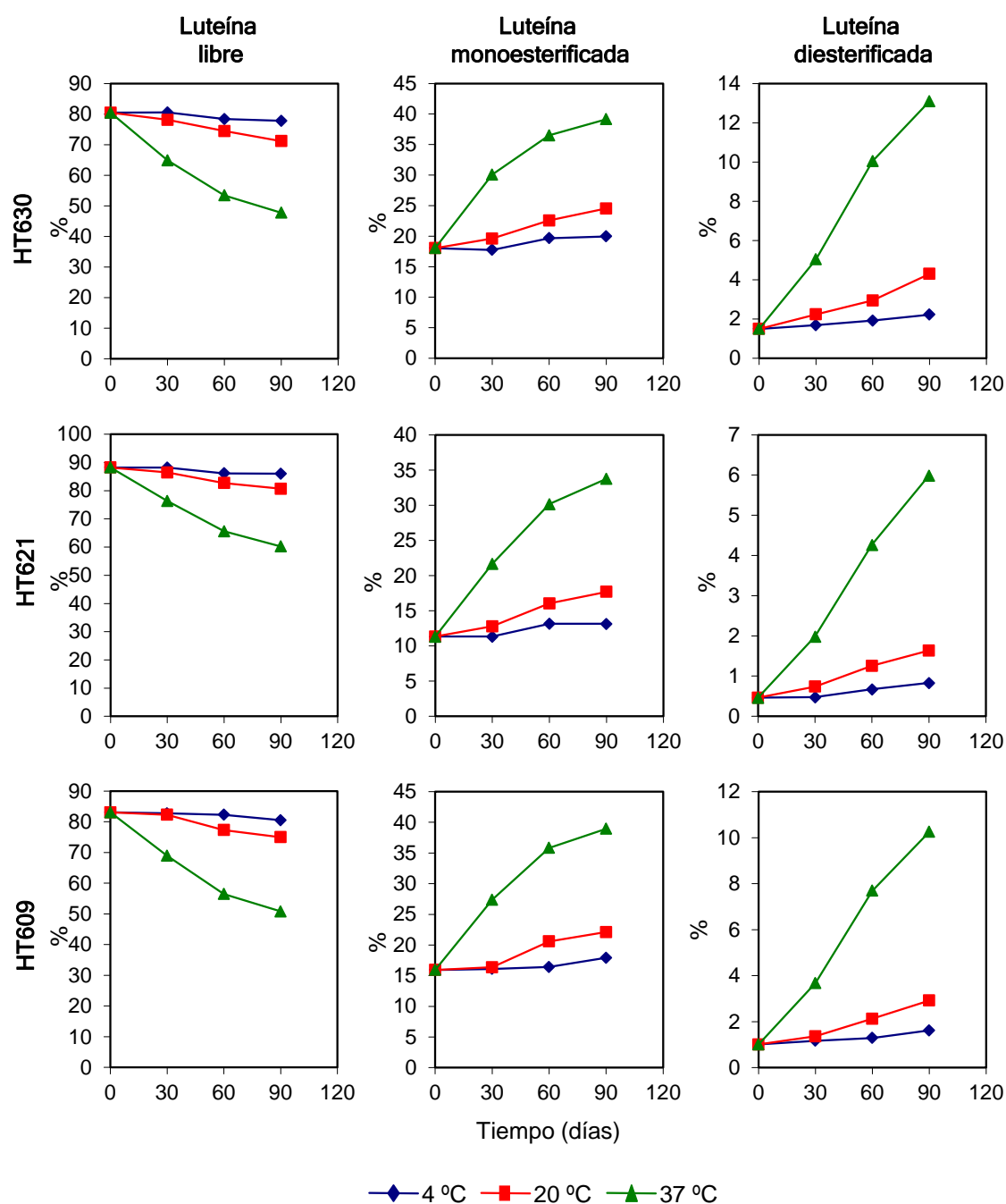


Figura 128. Efecto de la temperatura (4, 20 y 37°C) sobre el grado de esterificación de luteína durante el almacenamiento de semillas de tritordeum (líneas HT630, HT621 y HT609). Para cada variedad, los datos expresan la contribución porcentual de cada fracción (libre, monoesterificada y diesterificada) en función de la temperatura y el tiempo de almacenamiento. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de seis análisis (n=6; tres bloques x 2 determinaciones).

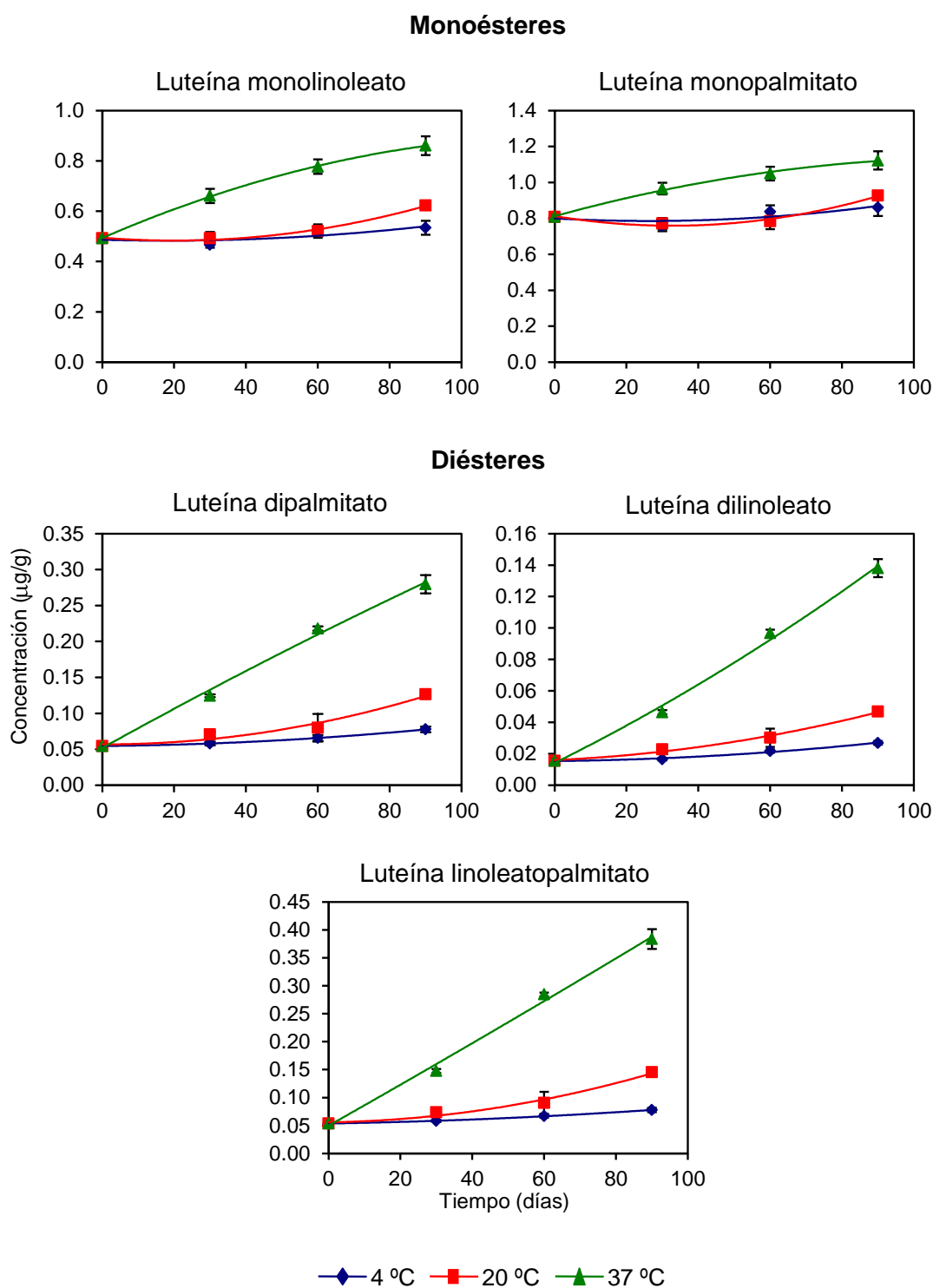
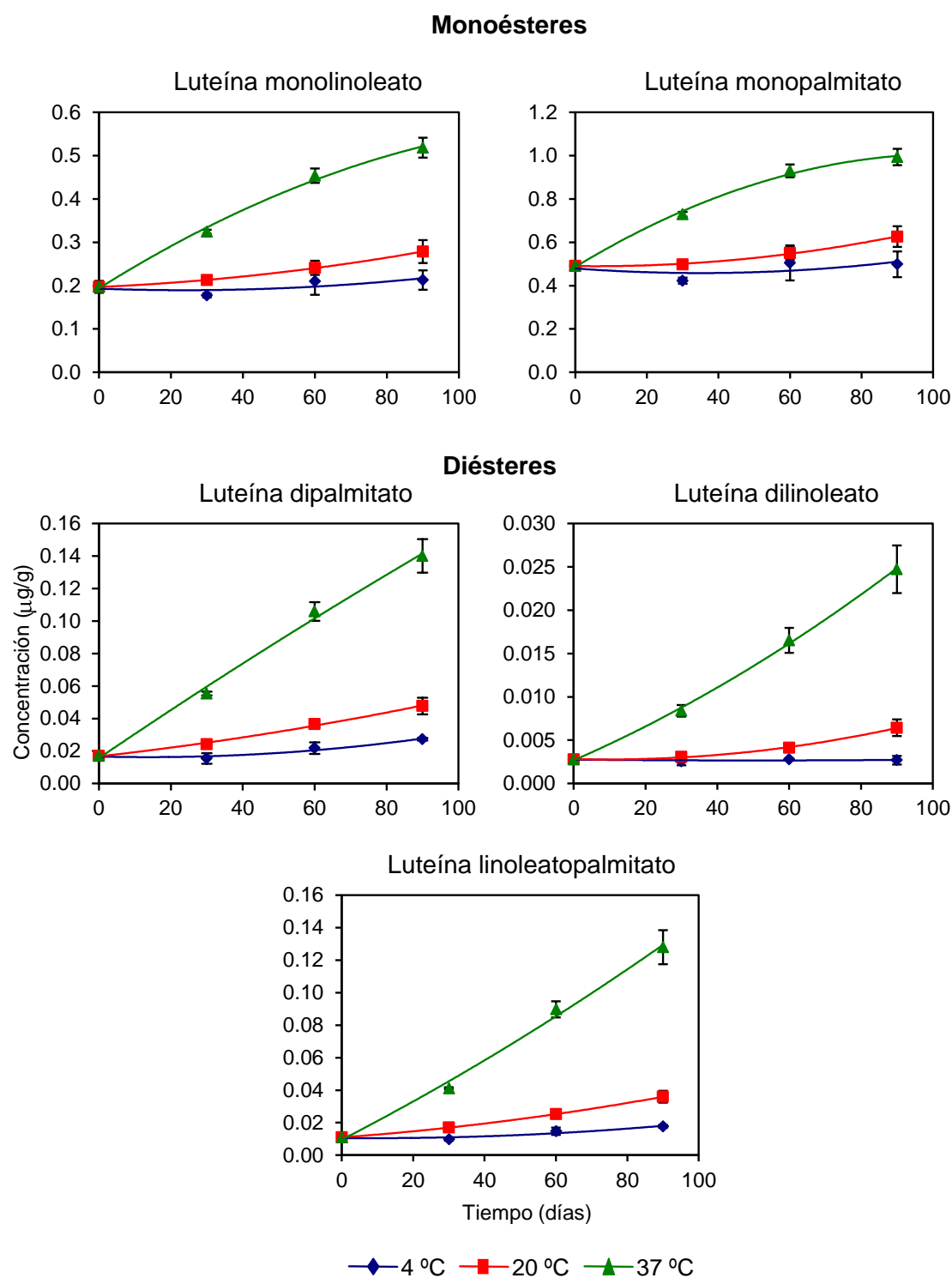
**HT630**

Figura 129. Evolución individual del contenido (µg/g) en monoésteres y diésteres de luteína presentes en los granos de la línea HT630 de tritordeum, durante el almacenamiento de las semillas a 4, 20 y 37°C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de seis análisis (n=6; tres bloques x 2 determinaciones).



HT621

Figura 130. Evolución individual del contenido ($\mu\text{g/g}$) en monoésteres y diésteres de luteína presentes en los granos de la línea HT621 de tritordeum, durante el almacenamiento de las semillas a 4, 20 y 37°C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de seis análisis ($n=6$; tres bloques x 2 determinaciones).

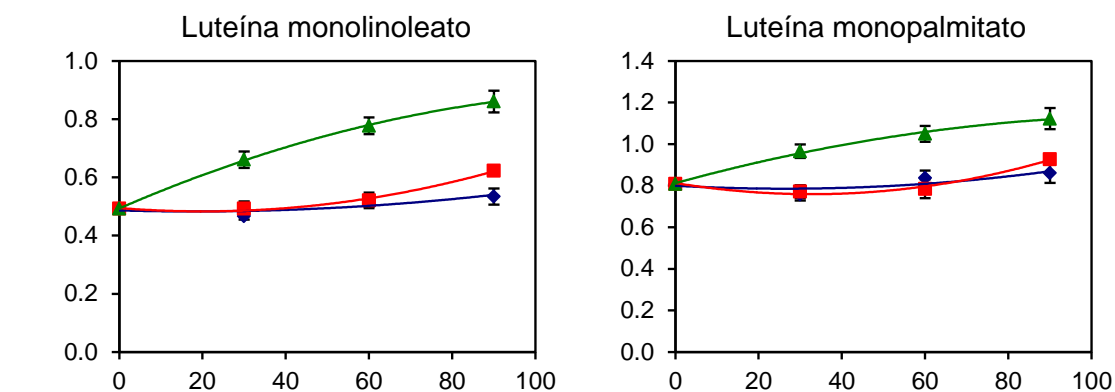
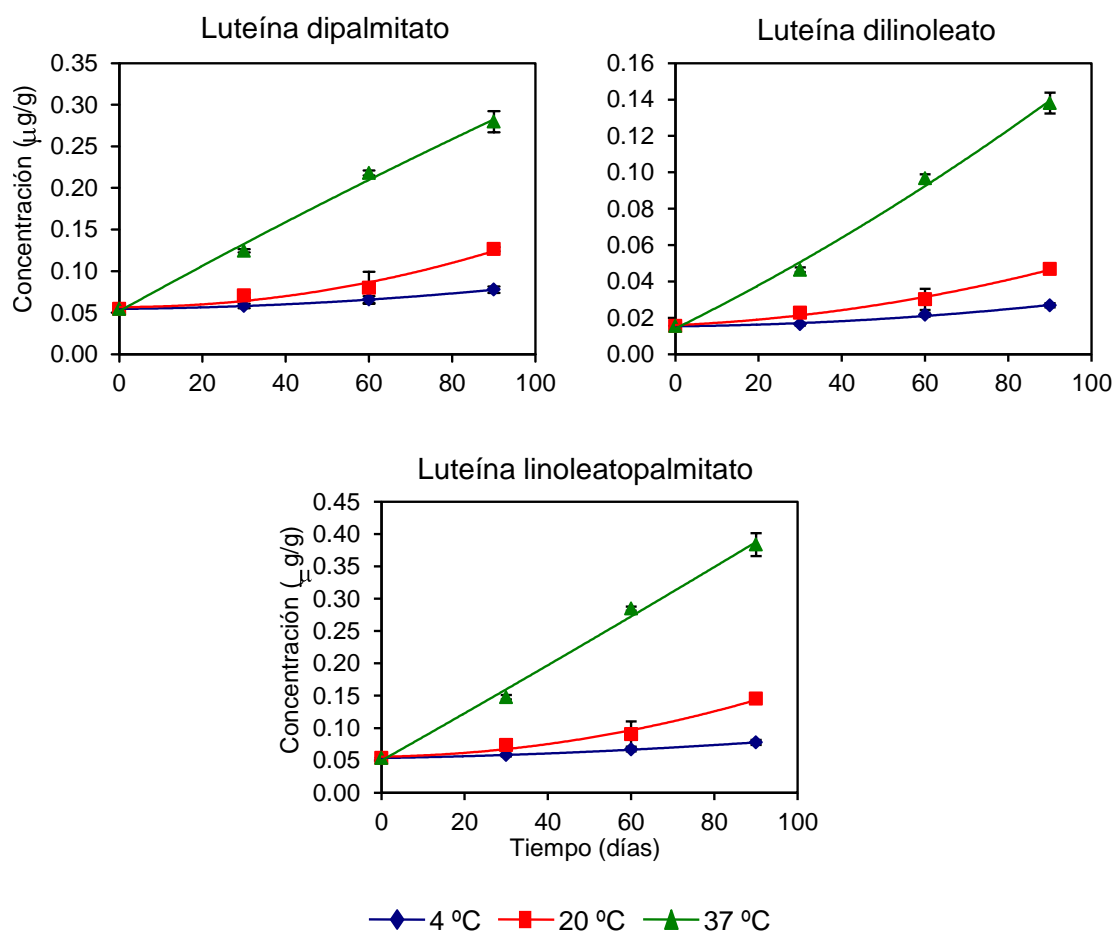
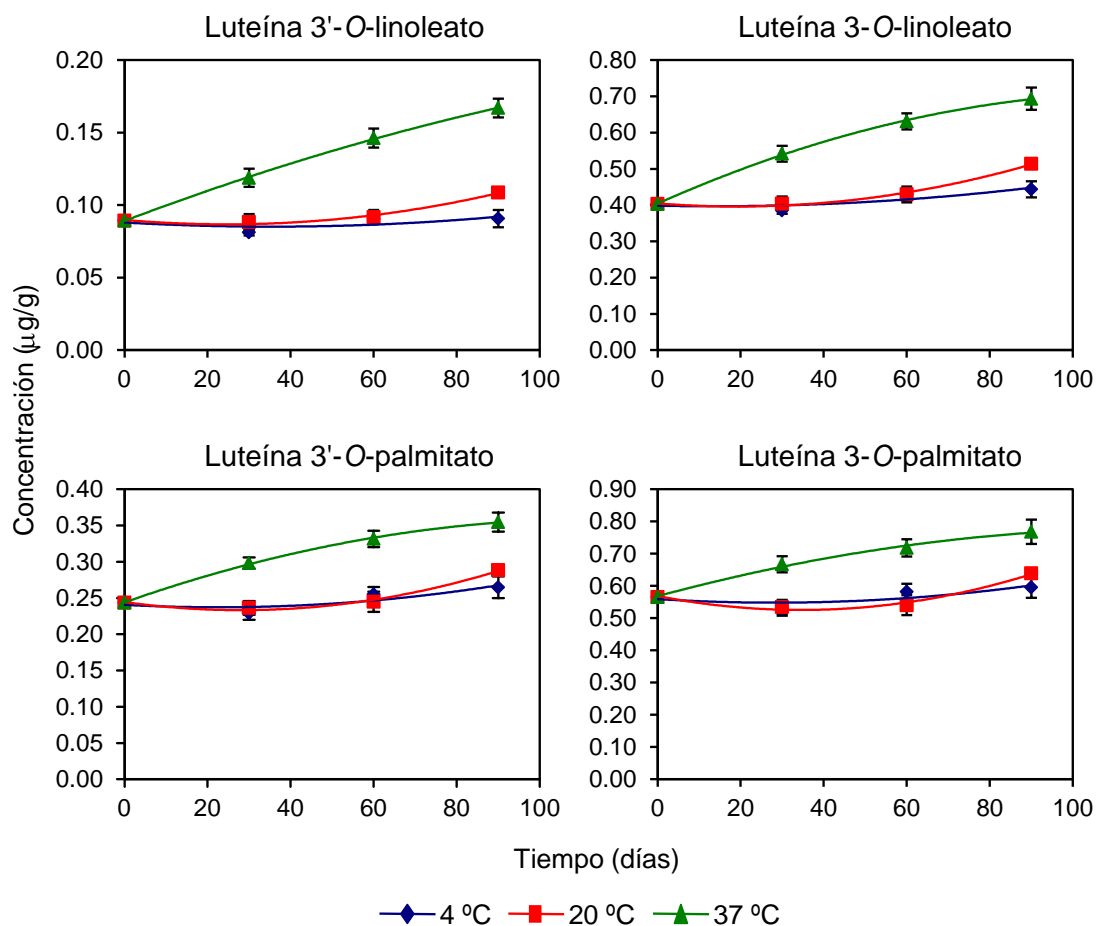
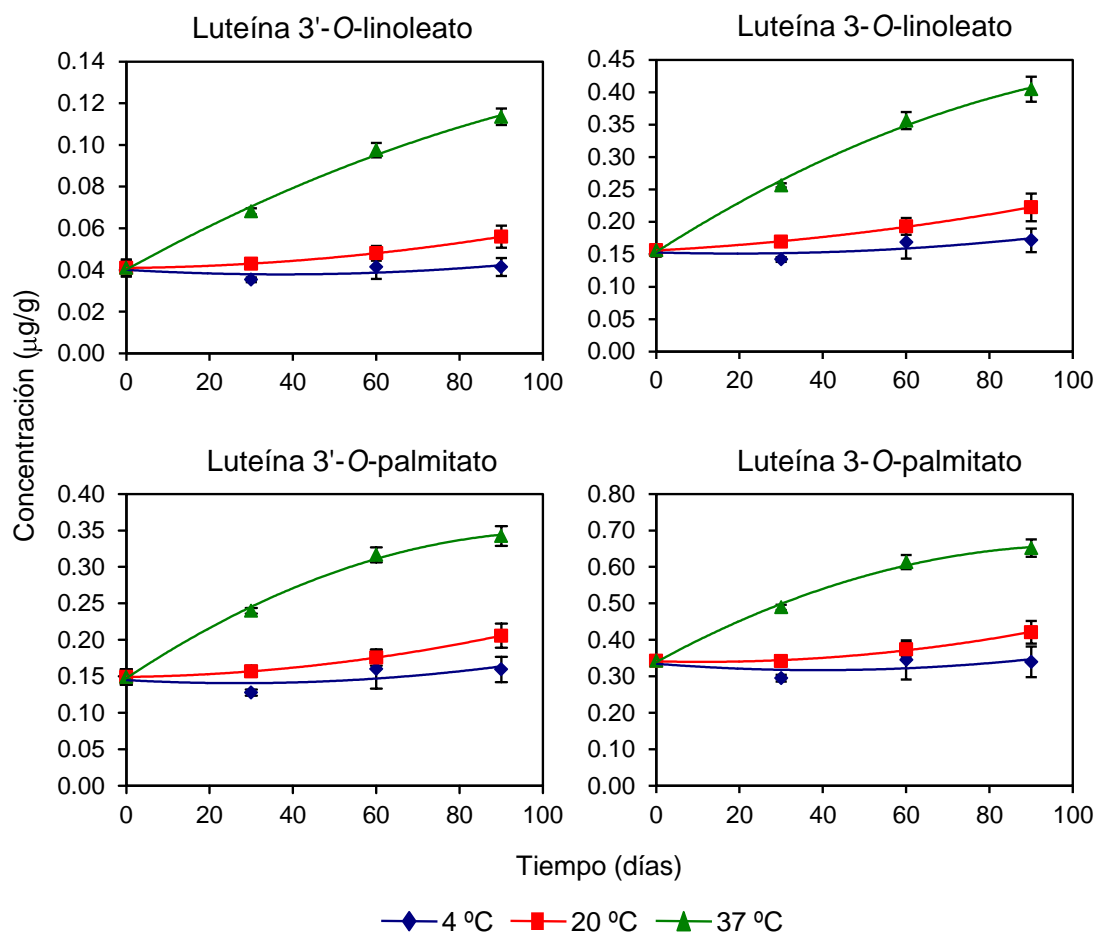
**Monoésteres****Diésteres****HT609**

Figura 131. Evolución individual del contenido (μg/g) en monoésteres y diésteres de luteína presentes en los granos de la línea HT609 de tritordeum, durante el almacenamiento de las semillas a 4, 20 y 37°C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de seis análisis (n=6; tres bloques x 2 determinaciones).



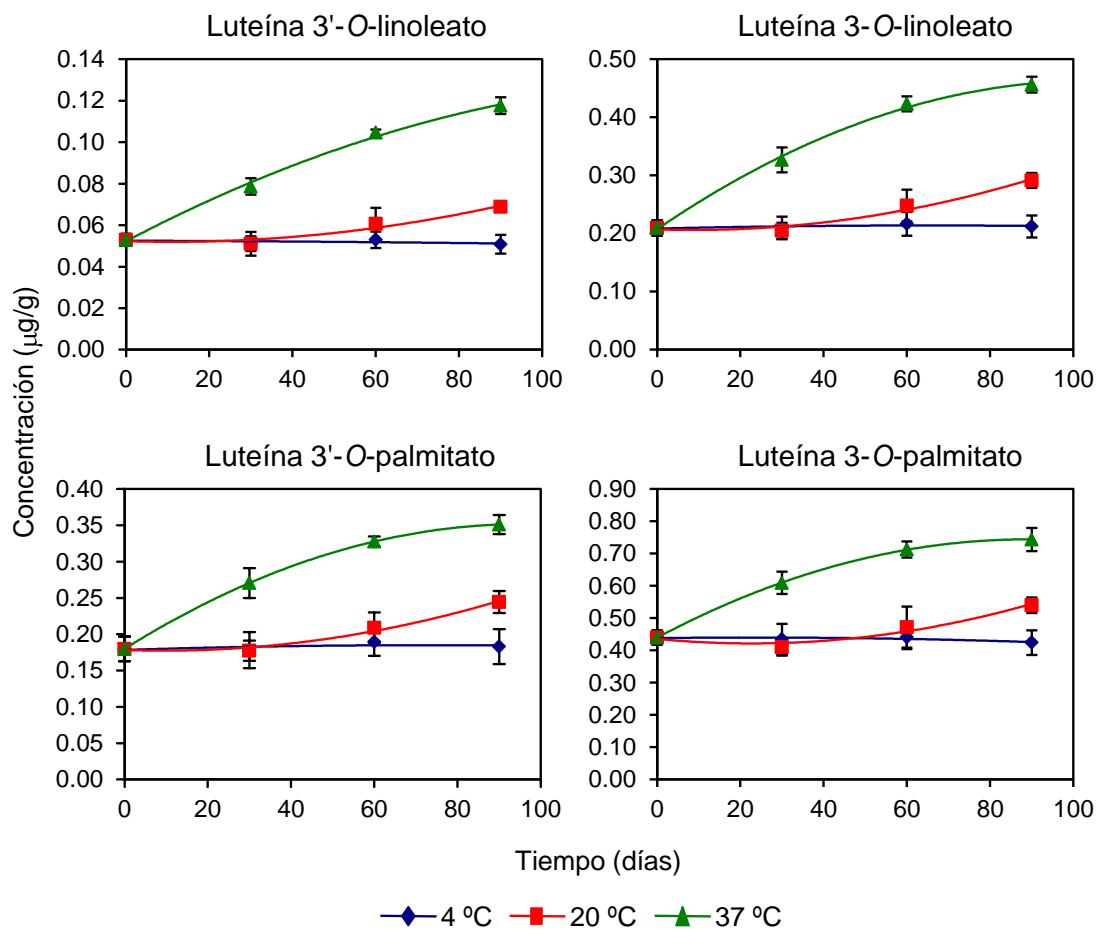
HT630

Figura 132. Cambios en el contenido de regiosómeros de luteína monolinoleato y luteína monopalmitato durante el almacenamiento de granos de tritordeum (HT630) a 4, 20 y 37°C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de seis análisis (n=6; tres bloques x 2 determinaciones).



HT621

Figura 133. Cambios en el contenido de regiosómeros de luteína monolinoleato y luteína monopalmitato durante el almacenamiento de granos de tritordeum (HT621) a 4, 20 y 37°C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de seis análisis (n=6; tres bloques x 2 determinaciones).



HT609

Figura 134. Cambios en el contenido de regiosómeros de luteína monolinoleato y luteína monopalmitato durante el almacenamiento de granos de tritordeum (HT609) a 4, 20 y 37°C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de seis análisis (n=6; tres bloques x 2 determinaciones).

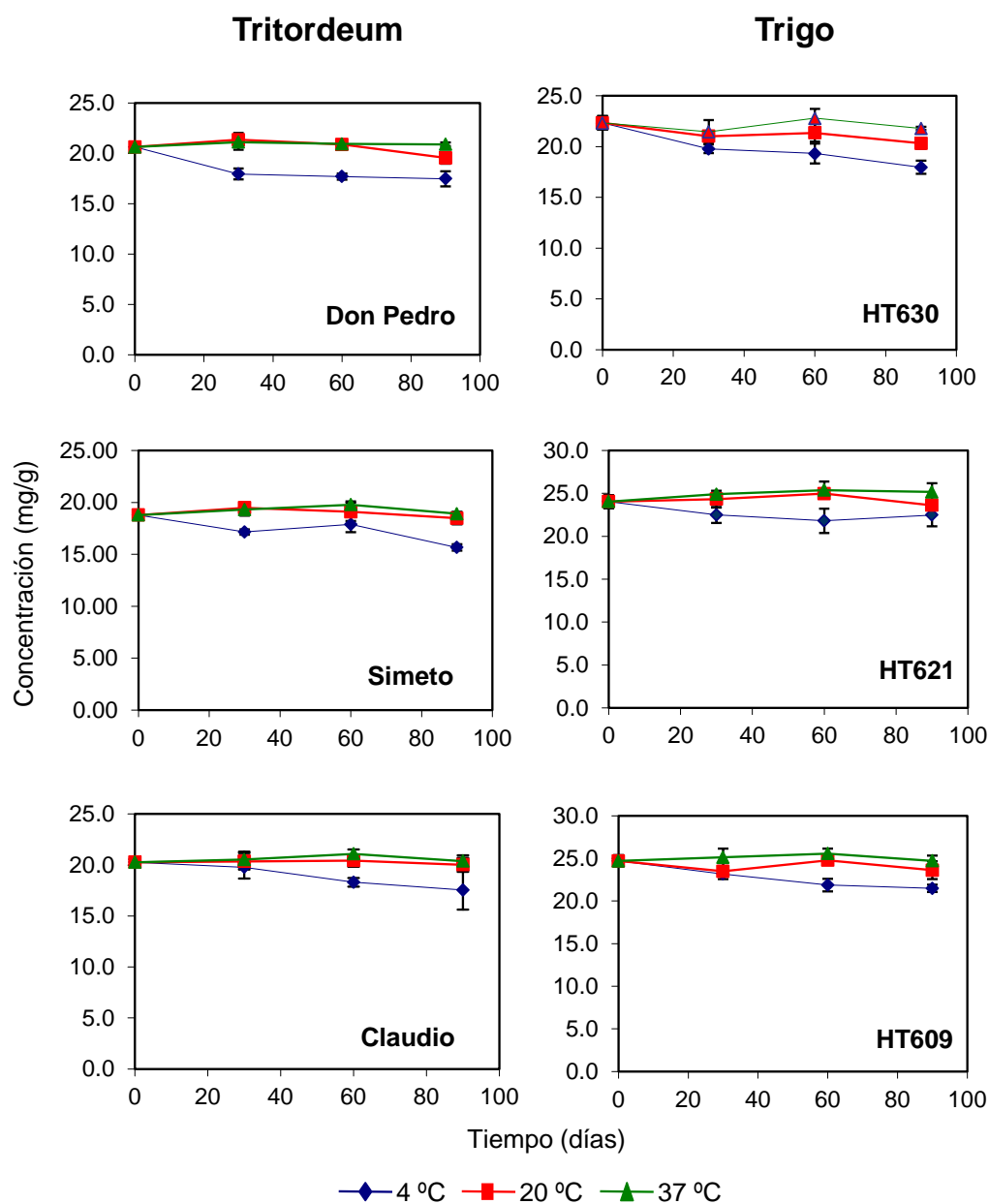


Figura 135. Evolución del contenido total de ácidos grasos ($\mu\text{g/g}$) presente en las variedades de trigo (Don Pedro, Simeto y Claudio) y en las líneas avanzadas de tritordeum (HT630, HT621 y HT609) durante el almacenamiento en postcosecha de los granos a 4, 20 y 37°C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de tres análisis ($n=3$).

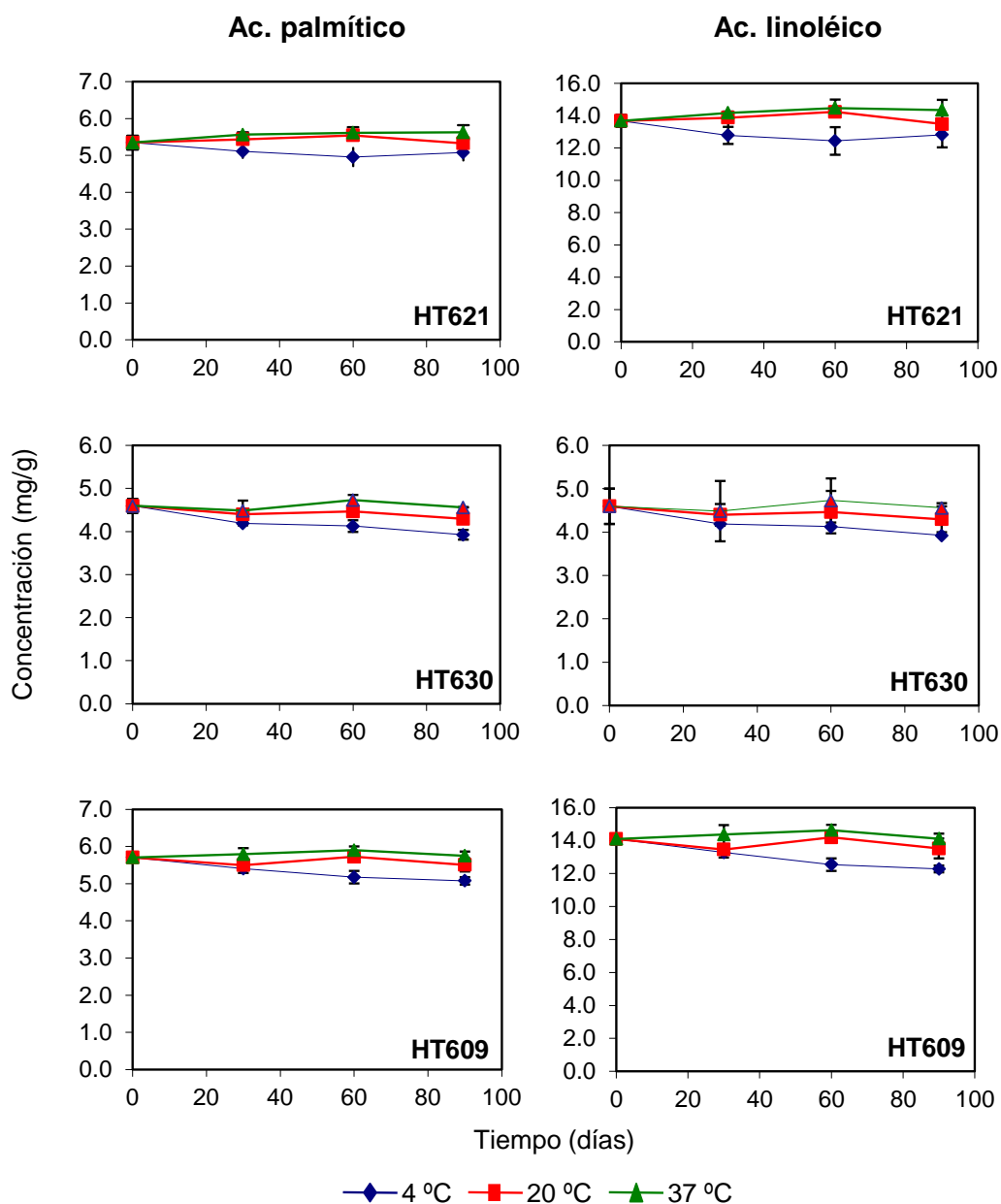


Figura 136. Evolución del contenido ($\mu\text{g/g}$) en ácido palmítico y ácido linoleico en las líneas avanzadas de tritordeum (HT630, HT621 y HT609) durante el almacenamiento en postcosecha de los granos a 4, 20 y 37°C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de tres análisis ($n=3$).



5.8. Estudio preliminar de evolución y estabilidad de pigmentos carotenoides durante el almacenamiento de harinas integrales de trigo duro y tritordeum.

Al igual que los granos de cereal, las harinas producidas a partir de éstos son almacenadas durante periodos de tiempo más o menos prolongados. Aunque la conservación esta favorecida por el reducido contenido de agua, se han observado pérdidas importantes en el contenido de antioxidantes de las harinas durante el almacenamiento, lo cual parece estar favorecido por la acción de la luz, la temperatura y la humedad, cobrando especial importancia los procesos de degradación oxidativa tanto directa como mediada por enzimas (Hidalgo y Brandolini, 2008b). En el presente apartado, y al objeto de estudiar el efecto de la temperatura sobre el contenido de los pigmentos carotenoides, se prepararon harinas integrales a partir de granos de tres variedades de trigo duro (Don Pedro, Simeto y Claudio) y tritordeum (HT630, HT621 y HT609), y se almacenaron durante un periodo de 90 días a varias temperaturas (4, 20, 37 y 50°C). La **Tabla 23** muestra la composición de partida de las muestras de harinas empleadas.

La **Figura 137** muestra la evolución del contenido en carotenoides totales (en la **Tabla A20** del *Anexo* incluye los valores medios y error estándar, junto con el análisis de significación estadística (test Duncan, $p < 0.05$) para cada variedad). Los resultados revelaron pérdidas importantes por degradación, alcanzándose los valores más reducidos de contenido carotenoide total a 50°C y al final del periodo de almacenamiento (90 días). Los valores medios de reducción del contenido carotenoide fueron del 83 % para tritordeum y del 94% para las harinas procedentes de trigos. Aunque existen pocos datos en la literatura sobre el comportamiento de este tipo de moléculas durante el almacenamiento de harinas de cereales, sin embargo, el estudio de la estabilidad de carotenoides durante el almacenamiento y procesado de alimentos ha cobrado desde hace mucho tiempo especial relevancia en el campo de la Tecnología de Alimentos. Son bien conocidos los trabajos pioneros de Livingston *et al.* (1968) en los que ya se describen pérdidas importantes de carotenoides, superiores al 50%, en harinas de frutos y vegetales como la alfalfa (*Medicago sativa*), y se destaca la importancia de la temperatura en dicho proceso. Los datos obtenidos son consistentes con el hecho de que la harina es un material más vulnerable a los cambios producidos por las condiciones de almacenamiento con respecto a las semillas, debido a la pérdida de compartimentación celular y al aumento de la superficie específica. Los carotenoides en los tejidos vegetales se encuentran estabilizados por asociaciones con proteínas, estructuras de membrana, etc. La alteración o disgregación de los tejidos puede provocar reducciones importantes por el efecto de la temperatura y por procesos oxidativos ya que el alto grado de insaturaciones que presentan en su estructura los hace fácilmente oxidables. Así, el estrés oxidativo generado por las propias condiciones

de almacenamiento, incrementado con el transcurso del tiempo y con el aumento de la temperatura, la cual acelera las reacciones degradativas, provoca un aumento de radicales libres que también es directamente generado por sistemas enzimáticos entre los que destaca la acción de la enzima lipoxigenasa (linoleato oxígeno óxido reductasa, EC 1.13.11.12). Lipoxigenasa cataliza la oxigenación esteroespecífica de los ácidos grasos poliinsaturados que contienen el sistema de dobles enlaces *cis,cis*-1,4-pentadieno, así como sus ésteres y glicéridos, para originar hidroperóxidos que posee una cadena con dobles enlaces *cis/trans* conjugados. El ácido linoleico (C18:2 Δ 9,12), resulta ser el ácido graso para el que presenta mayor afinidad y el más estudiado (Mínguez Mosquera *et al.*, 1997; Trono *et al.*, 1999).

Tabla 23. Composición cualitativa y cuantitativa ($\mu\text{g/g}^*$) de pigmentos carotenoides presentes en harinas integrales de trigo duro y tritordeum.

Pigmento**	Tritordeum			Trigo		
	HT630	HT621	HT609	Don Pedro	Simeto	Claudio
All- <i>trans</i> -Zeaxanteno	-	-	-	0.205 \pm 0.017 ^a	0.144 \pm 0.024 ^b	0.167 \pm 0.006 ^c
All- <i>trans</i> -Luteína	7.983 \pm 0.188 ^a	7.597 \pm 0.438 ^a	6.996 \pm 0.404 ^b	1.003 \pm 0.097 ^a	0.778 \pm 0.092 ^b	0.888 \pm 0.041 ^c
9- <i>cis</i> -Luteína	0.412 \pm 0.006 ^a	0.353 \pm 0.014 ^b	0.326 \pm 0.011 ^c	0.074 \pm 0.007 ^a	0.055 \pm 0.008 ^b	0.064 \pm 0.002 ^a
13- <i>cis</i> -Luteína	0.620 \pm 0.005 ^a	0.617 \pm 0.022 ^a	0.560 \pm 0.023 ^b	0.124 \pm 0.011 ^a	0.083 \pm 0.014 ^b	0.107 \pm 0.004 ^a
Luteína monolinoleato	1.018 \pm 0.019 ^a	0.418 \pm 0.048 ^b	0.541 \pm 0.028 ^c	-	-	-
Luteína monopalmitato	1.556 \pm 0.031 ^a	1.006 \pm 0.054 ^b	1.232 \pm 0.058 ^c	-	-	-
Luteína linoleatopalmitato	0.208 \pm 0.003 ^a	0.040 \pm 0.005 ^b	0.071 \pm 0.003 ^c	-	-	-
Luteína dipalmitato	0.198 \pm 0.008 ^a	0.069 \pm 0.007 ^b	0.112 \pm 0.010 ^c	-	-	-
Luteína dilinoleato	0.040 \pm 0.006 ^a	0.008 \pm 0.001 ^b	0.010 \pm 0.001 ^b	-	-	-
α -Caroteno	-	-	-	0.014 \pm 0.000 ^a	0.008 \pm 0.001 ^b	0.018 \pm 0.001 ^c
β -Caroteno	0.081 \pm 0.004 ^a	0.085 \pm 0.005 ^a	0.103 \pm 0.005 ^b	0.029 \pm 0.001 ^a	0.024 \pm 0.004 ^b	0.027 \pm 0.001 ^c
Luteína total	12.034 \pm 0.256 ^a	10.109 \pm 0.579 ^b	9.849 \pm 0.528 ^b	1.202 \pm 0.113 ^a	0.916 \pm 0.111 ^a	1.058 \pm 0.047 ^a
Carotenoides totales	12.115 \pm 0.260 ^a	10.193 \pm 0.584 ^b	9.952 \pm 0.533 ^b	1.449 \pm 0.132 ^a	1.091 \pm 0.139 ^a	1.272 \pm 0.055 ^a
Monoésteres totales	2.574 \pm 0.050 ^a	1.424 \pm 0.100 ^b	1.773 \pm 0.086 ^c	-	-	-
Diésteres totales	0.446 \pm 0.011 ^a	0.117 \pm 0.012 ^b	0.193 \pm 0.011 ^c	-	-	-
Esteres totales	3.019 \pm 0.060 ^a	1.541 \pm 0.110 ^b	1.966 \pm 0.091 ^c	-	-	-

*La tabla representa los valores medios y la desviación estándar para cuatro replicados.

**Para cada pigmento, y con respecto a cada tipo de muestra (trigo duro o tritordeum), los valores que muestran distinto superíndice presentan diferencias significativas (test Duncan, $p < 0.05$).

El concurso de la enzima lipoxigenasa en el sistema analizado en este trabajo resulta fácilmente explicable debido no solo a que dicha enzima se encuentra extensamente distribuida en cereales (Borrelli *et al.*, 1999), sino también a la presencia de su principal sustrato el ácido linoleico, que resulta además el más abundante en la



composición de ácidos grasos de las semillas sometidas a estudio. Por otro lado, la disgregación de los granos de cereal durante la obtención de las harinas, y la consecuente pérdida de compartimentación tisular y celular, facilita el contacto entre estos sistemas enzimáticos y sus sustratos aumentando las posibilidades de éxito de dichas reacciones enzimáticas. Además las condiciones ensayadas en el presente trabajo, como es el aumento de temperatura, aceleran dichas reacciones, pero aunque no se trate de una enzima excesivamente lábil a los tratamientos térmicos, es predecible que a la temperatura de 50°C lipoxigenasa tenga reducida su actividad. En cualquier caso, el efecto directo de los radicales libres sobre los carotenoides provoca la rotura de la cadena de polieno originando productos apocarotenoides de cadena corta, cetonas y epóxidos (Britton y Hornero-Méndez, 1997; Sandmann *et al.*, 2006). Cabe mencionar que en los cromatogramas correspondientes al análisis de carotenoides en muestras mantenidas a 37 y 50°C se observó la presencia de productos de degradación de carotenoides (compuestos con mayor polaridad y cromóforo más corto), siendo su presencia más relevante con el transcurso del tiempo de almacenamiento.

De manera similar a lo observado durante los experimentos de conservación en postcosecha de granos, los carotenoides en tritordeum mostraron una mayor estabilidad que en trigo, amortiguándose más los cambios a las temperaturas de 4, 20 y 37°C (**Figura 137**). Por el contrario, en las variedades de trigo duro el aumento de la temperatura se tradujo directamente en una degradación más acusada de los carotenoides, alcanzándose a 37°C descensos del orden del 78%. Esta diferencia puede ser atribuida no solo al mayor contenido inicial de carotenoides en tritordeum, sino más bien a la esterificación de luteína con ácido grasos. Hay que hacer notar que mientras en los experimentos de almacenamiento de granos coexistían al mismo tiempo fenómenos de síntesis y catabolismo, en el caso de la harina es esperable que solo intervengan procesos catabólicos, de naturaleza físico-química y/o enzimática, que se vean acelerados por efecto de la temperatura. En la **Figura 138** se muestra la evolución de los perfiles cromatográficos obtenidos para las harinas de tritordeum (HT621) y trigo duro (Don Pedro) durante el almacenamiento.

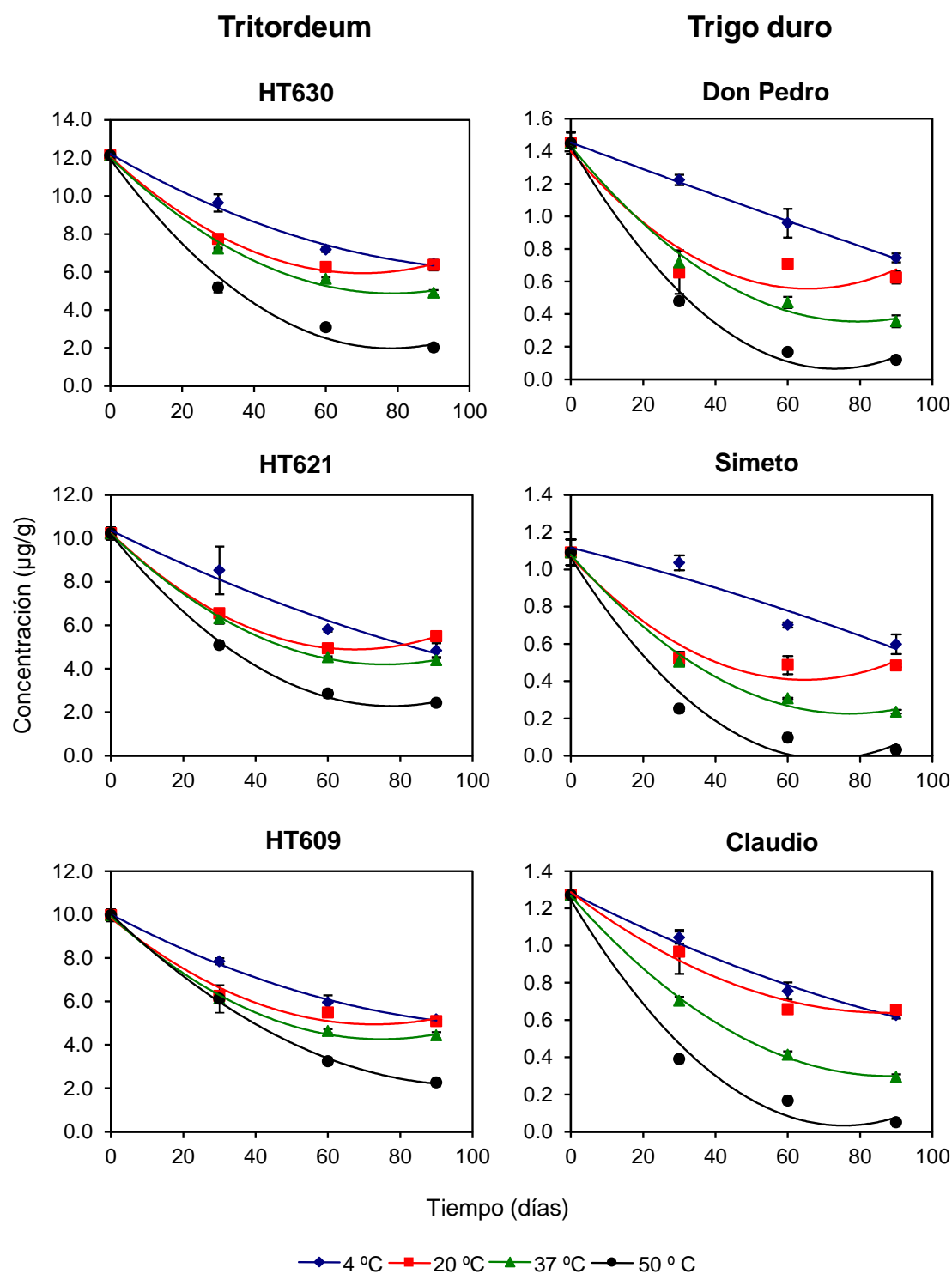
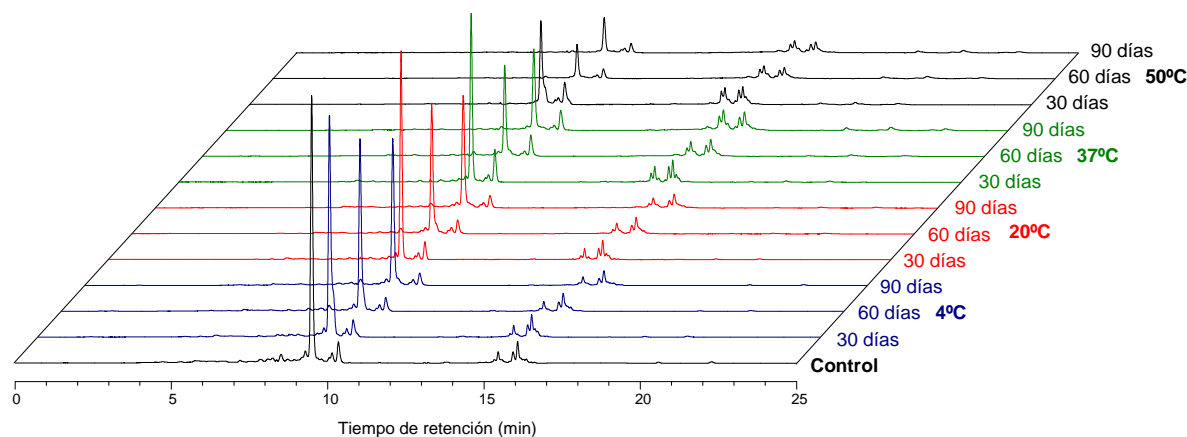


Figura 137. Evolución del contenido carotenoide total (µg/g) presente en harinas integrales de trigo (variedades Don Pedro, Simeto y Claudio) y tritordeum (variedades HT630, HT621 y HT609), durante el almacenamiento de harinas a 4, 20, 37 y 50 °C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de tres análisis.

Tritordeum (HT621)



Trigo duro (Don Pedro)

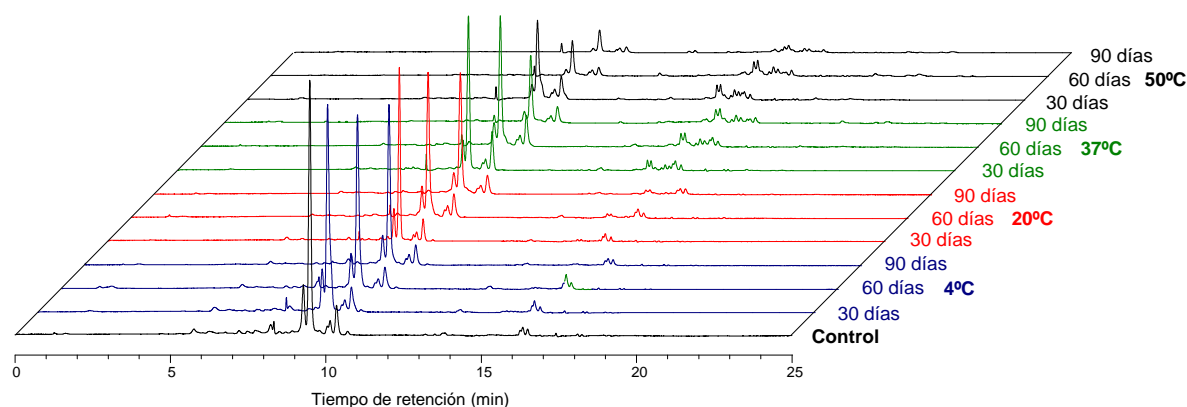


Figura 138. Evolución del perfil cromatográfico de pigmentos carotenoides presentes en harinas integrales de tritordeum (HT621) y trigo duro (Don Pedro) durante el almacenamiento a 4, 20, 37 y 50°C.

Estas observaciones son congruentes con los datos encontrados para la evolución de la composición en carotenoides individuales. Las **Figuras 139, 140 y 141** muestran los cambios producidos en el contenido de *all-trans*-zeaxanteno, *all-trans*-luteína, *cis*-luteína, α -caroteno y β -caroteno en las variedades de trigo duro estudiadas (en la **Tablas A21-A23** del *Anexo* se incluyen los valores medios y el error estándar, junto con el análisis de significación estadística (test Duncan, $p < 0.05$) para cada variedad). En general, la variedad Don Pedro fue la que exhibió una degradación más progresiva para cada uno de los carotenoides en función de la temperatura, y las dos restantes variedades (Claudio y Simeto) presentaron un descenso ligeramente más amortiguado a las temperaturas 4 y 20°C, aunque las pérdidas en estas variedades al final del periodo de almacenamiento (temperatura 50°C y 90 días) fueron más acusadas, llegando incluso a la desaparición de α



y β -caroteno. Estos descensos ponen también de manifiesto la propia actividad antioxidante de los carotenoides en la eliminación de los radicales libres que se deben generar durante el periodo de almacenamiento, siendo β -caroteno uno de los carotenoides más susceptible a la oxidación (Sandmann *et al.*, 2006).

Con respecto al análisis de carotenoides individuales en las líneas de tritordeum (**Figuras 142, 143 y 144; Tablas A24-A26**), la evolución de all-*trans*-luteína, *cis*-luteína y β -caroteno siguió un claro patrón de degradación en función del tiempo y la temperatura, observándose descensos del 93% al final del periodo de almacenamiento. Por el contrario, la pauta de evolución general para las fracciones de ésteres de luteína (monoésteres y diésteres) fue más conservativa, mostrando menores pérdidas que para luteína libre, del orden del 50%, lo que refleja nuevamente una mayor estabilidad de las formas esterificadas frente a las condiciones de almacenamiento ensayadas. Esta conclusión se deduce claramente cuando se observa la evolución relativa de las fracciones libres, monoesterificadas y diesterificadas (**Figura 145**), apreciándose como el descenso de luteína libre se contrarresta con el aumento de las formas esterificadas, siendo más acusada para diésteres, indicando una mayor estabilidad de los mismos, lo que finalmente se traduce a efectos globales en unos descensos más amortiguados y en las menores pérdidas de carotenoides que finalmente se han registrado.

El análisis de las fracciones de luteína esterificada en harinas resultó más complejo que en los granos debido a que se trata de un material más vulnerable a las condiciones de ensayo, lo cual se pone marcadamente de manifiesto en las muestras mantenidas a 37 y 50°C. No obstante, el análisis detallado de la evolución de dichas fracciones puede arrojar datos importantes sobre el fenómeno de la esterificación y su relación con la estabilidad. En las **Figuras 146, 147 y 148**, se muestra la evolución individualizada de los ésteres de luteína en las harinas de tritordeum. De forma general, se observa una tendencia a la degradación de la fracción de monoésteres más acusada que para la fracción de diésteres, que incluso a veces presenta incrementos de concentración. Con respecto a la fracción de monoésteres, para las tres líneas de tritordeum, los niveles de luteína monopalmitato resultaron ser más elevados que los de monolinoleato, en torno a 1.4, 1.2 y 1.5 veces para HT621, HT609 y HT630, respectivamente, guardando bastante similitud con los datos obtenidos para granos. En todos los casos, a 50°C se observaron descensos en la fracción de monoésteres que coincidieron con aumentos en la fracción de las formas diesterificadas, lo que indicaría que dichos aumentos en los diésteres ocurren a expensas de los monoésteres, sugiriendo la posible participación de enzimas tipo lipasas, que inducidas por las condiciones del ensayo, catalizarían la formación de éstos ésteres mediante una ruta



metabólica distinta a la que opera *in vivo*. Este extremo deberá ser confirmado en futuros ensayos. Dentro de la fracción de diésteres, luteína dipalmitato fue el más abundante excepto para HT630 en el que el contenido de luteína linoleatopalmitato es aproximadamente 4.8% superior. En las tres líneas de tritordeum luteína dilinoleato se encontró en cantidades trazas. Los aumentos registrados a las temperaturas de 37 y 50°C resultaron ser más acusados para el caso de luteína dilinoleato, siendo de 5 veces para HT621, 4.5 veces para HT609 y de 3 veces para HT630. De manera análoga, cuando se analizó el comportamiento de los regioisómeros de luteína monolinoleato y luteína monopalmitato (**Figuras 149, 150 y 151**) se observaron incrementos de concentración para los monoésteres con ácido linoléico durante las primera mitad del almacenamiento a las temperaturas más elevadas (37 y 50°C), destacando el monoéster en la posición 3' (luteína-3'-*O*-linoleato). Cabe señalar que éste último es el monoéster que se encuentra en menor concentración en los granos de tritordeum, lo que apoya que la actividad esterificante involucrada en estas transformaciones en harina se deba al concurso de enzimas diferentes de las que operan de forma natural en los granos. Una observación interesante, y que debe ser destacada, fue la aparición de ésteres de luteína en las muestras de harinas de trigo duro, especialmente a las temperaturas más altas. Los niveles de trazas impidieron su correcta cuantificación, pero ponen de manifiesto que este proceso de esterificación en harinas se da en ambos tipos de cereal.

La relación de interacción entre ácido graso y pigmento no solo podría implicar una protección para los propios carotenoides, como ya se ha apuntado, sino además para los ácidos grasos, ya que existen lipoxigenasas, como es la tipo 1 (Lox-1), específicas para ácidos grasos no esterificados (Trono *et al.*, 1999). En este sentido, el contenido de carotenoides presente en los cereales y en sus productos derivados tiene implicaciones también para preservar a dichos cultivos de la oxidación lipídica ya que los hidroperóxidos resultantes de la actividad de lipoxigenasa contribuyen a la formación de muchos compuestos volátiles, como aldehídos y cetonas, que son los responsables tanto del flavor deseable de los vegetales, asociados con el metabolismo normal de la planta como del flavor ("off-flavour") no deseable que se produce después de la recolección y durante el almacenamiento o procesado en general de los vegetales (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1997). Así mismo de forma general, el contenido en otros antioxidantes como tocoferoles (Hidalgo y Brandolini, 2008), pueden presentar un efecto protector o sinergista contribuyendo finalmente a una mayor estabilidad de harinas y en definitiva de cereales almacenados.

La **Tabla 24** resume los datos de constante de velocidad (k) y de vida media ($t_{1/2}$) obtenidos tras ajustar los datos de contenido carotenoide total a un modelo cinético de primer orden, ya que a priori éste parece el más indicado según el perfil exponencial de las



variaciones de concentración observadas (**Figuras 137**). Como se puede observar a temperaturas bajas o moderadas, la velocidad de degradación de los pigmentos fue bastante similar para las harinas de ambos cereales. Por el contrario, a temperaturas más elevadas las diferencias fueron muy marcadas, mostrando los trigos velocidades de degradación cercanas al doble con respecto a tritordeum, lo que deriva en tiempos de vida media significativamente menores. Sin lugar a dudas, la presencia destacada de ésteres de luteína en tritordeum debe mediar un papel importante en la mayor estabilidad de los pigmentos en tritordeum.

Tabla 24. Constante de velocidad (k ; días⁻¹) y tiempo de vida media ($t_{1/2}$; días) para el contenido total carotenoides en harinas integrales de trigo duro y tritordeum almacenadas a diferentes temperaturas según el modelo cinético de primer orden ($C=C_0\text{-exp}(kt)$).

Temperatura (°C)	Trigo					
	Don Pedro		Simeto		Claudio	
	k (días ⁻¹)	$t_{1/2}$ (días)	k (días ⁻¹)	$t_{1/2}$ (días)	k (días ⁻¹)	$t_{1/2}$ (días)
4	0.007	93	0.007	95	0.007	87
20	0.008	85	0.008	83	0.008	85
37	0.015	45	0.017	41	0.016	42
50	0.028	24	0.039	18	0.035	20

Temperatura (°C)	Tritordeum					
	HT630		HT621		HT609	
	k (días ⁻¹)	$t_{1/2}$ (días)	k (días ⁻¹)	$t_{1/2}$ (días)	k (días ⁻¹)	$t_{1/2}$ (días)
4	0.007	95	0.008	96	0.007	97
20	0.007	96	0.007	79	0.007	92
37	0.010	70	0.009	72	0.009	77
50	0.019	35	0.016	43	0.017	41

El estudio comparativo de la evolución de carotenoides durante el almacenamiento de granos y harinas arroja diferencias importantes, mostrando pérdidas bastantes más acusadas para las harinas, y siendo éstas más importantes para trigos que para tritordeum. Los datos presentados aquí concuerdan con el hecho de que la semilla es un sistema vivo, poniéndose de manifiesto el papel de la esterificación como un mecanismo que proporciona estabilidad a las xantofilas y que es activado en condiciones de estrés. En cualquier caso las condiciones de almacenamiento claramente afectan a la estabilidad y por tanto al contenido de carotenoides de cereales, siendo el aumento de la temperatura uno de los



factores más determinantes junto con el estrés oxidativo. Los resultados obtenidos en este estudio preliminar indican la necesidad de efectuar experimentos con tiempos de almacenamientos más prolongados que permitan realizar un estudio pormenorizado del efecto sobre los pigmentos, así como determinar los parámetros cinéticos que caractericen los procesos de degradación y posibiliten la estimación de la vida útil del producto.

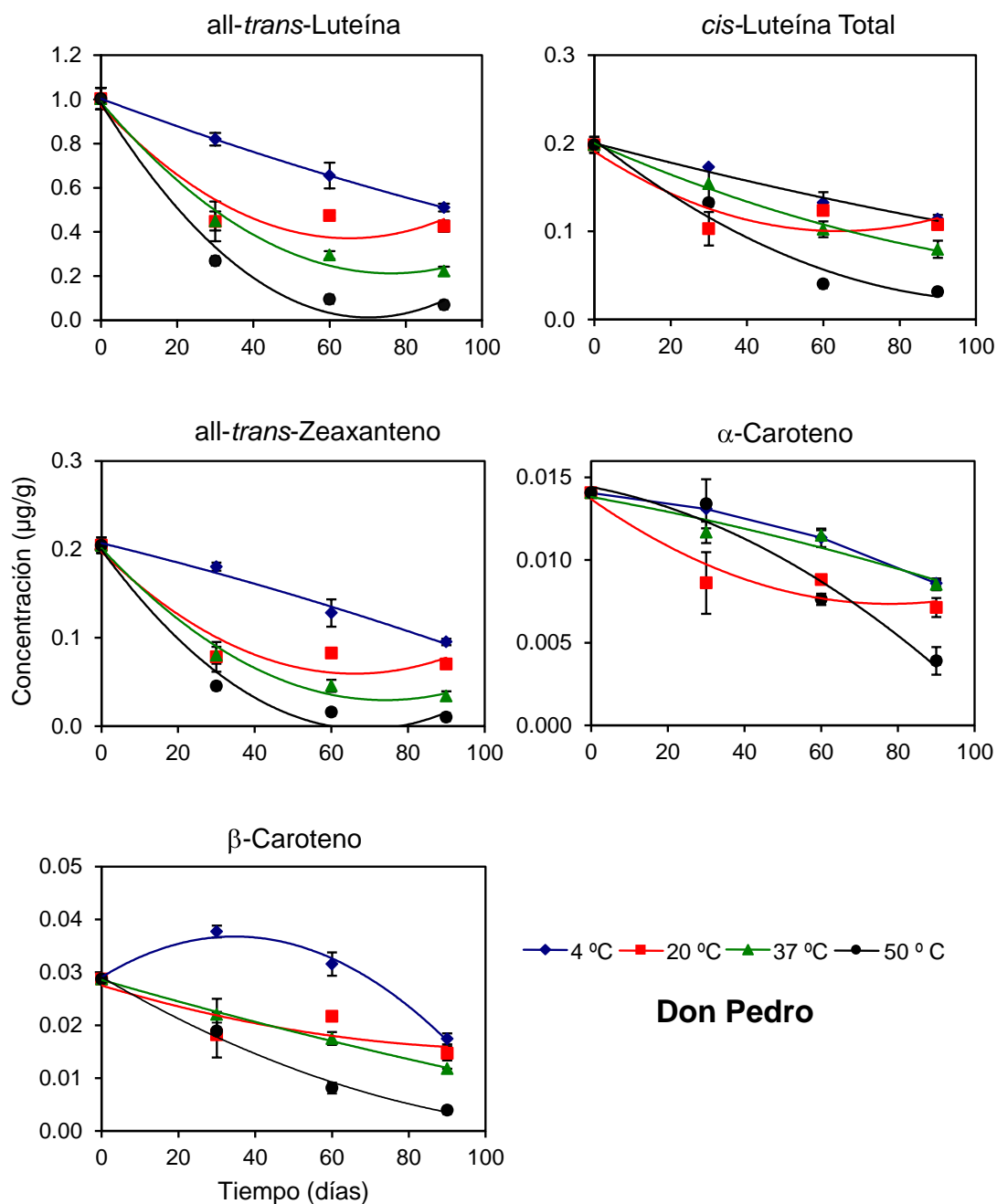


Figura 139. Evolución del contenido ($\mu\text{g/g}$) en carotenoides individuales (*all-trans*-zeaxanteno, *all-trans*-luteína, *cis*-luteína, α -caroteno y β -caroteno) presentes en la harina de la variedad Don Pedro de trigo duro, durante el almacenamiento a 4, 20, 37 y 50°C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de tres análisis.

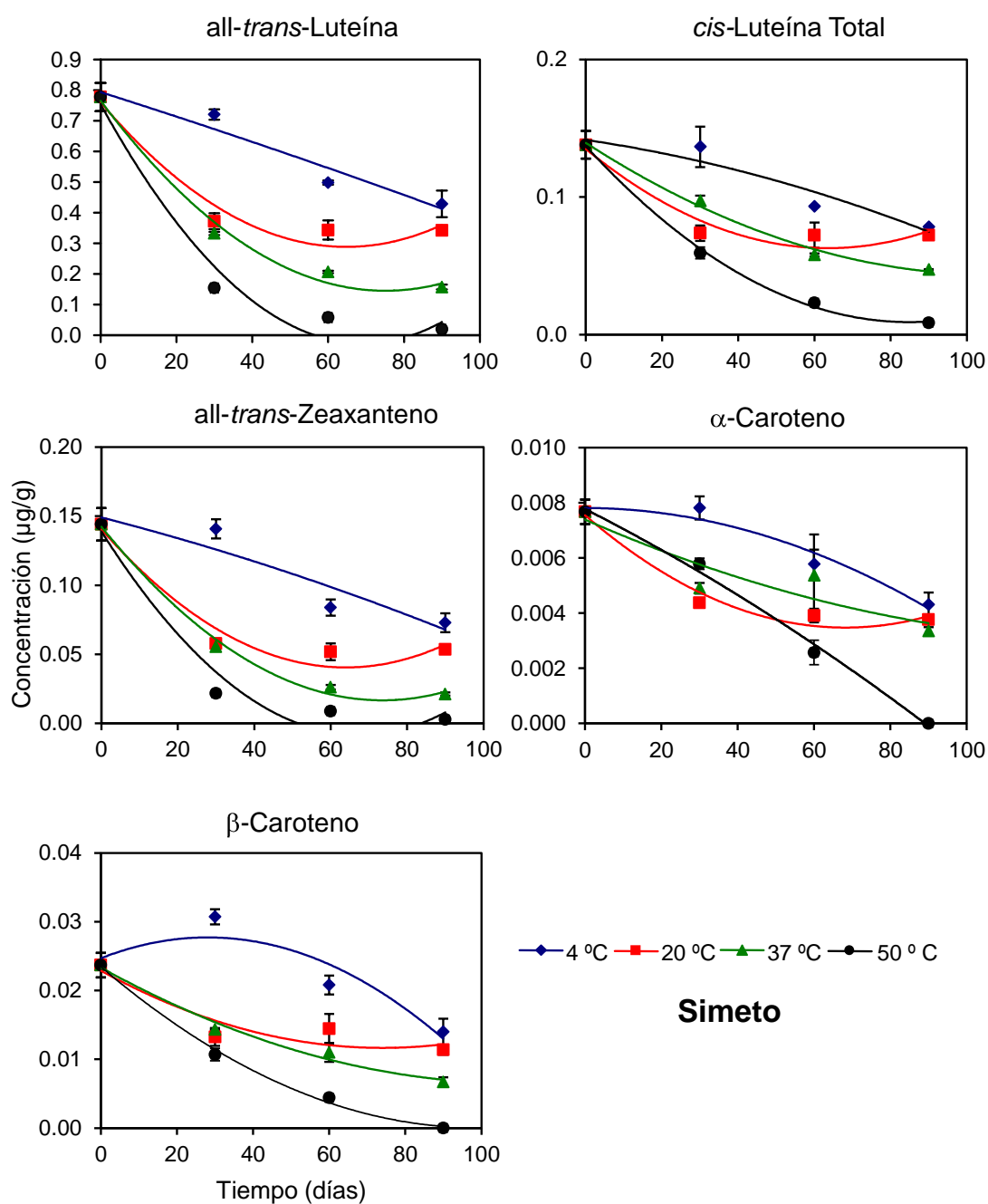


Figura 140. Evolución del contenido (μg/g) en carotenoides individuales (*all-trans*-zeaxanteno, *all-trans*-luteína, *cis*-luteína, α-caroteno y β-caroteno) presentes en la harina de la variedad Simeto de trigo duro, durante el almacenamiento a 4, 20, 37 y 50°C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de tres análisis.

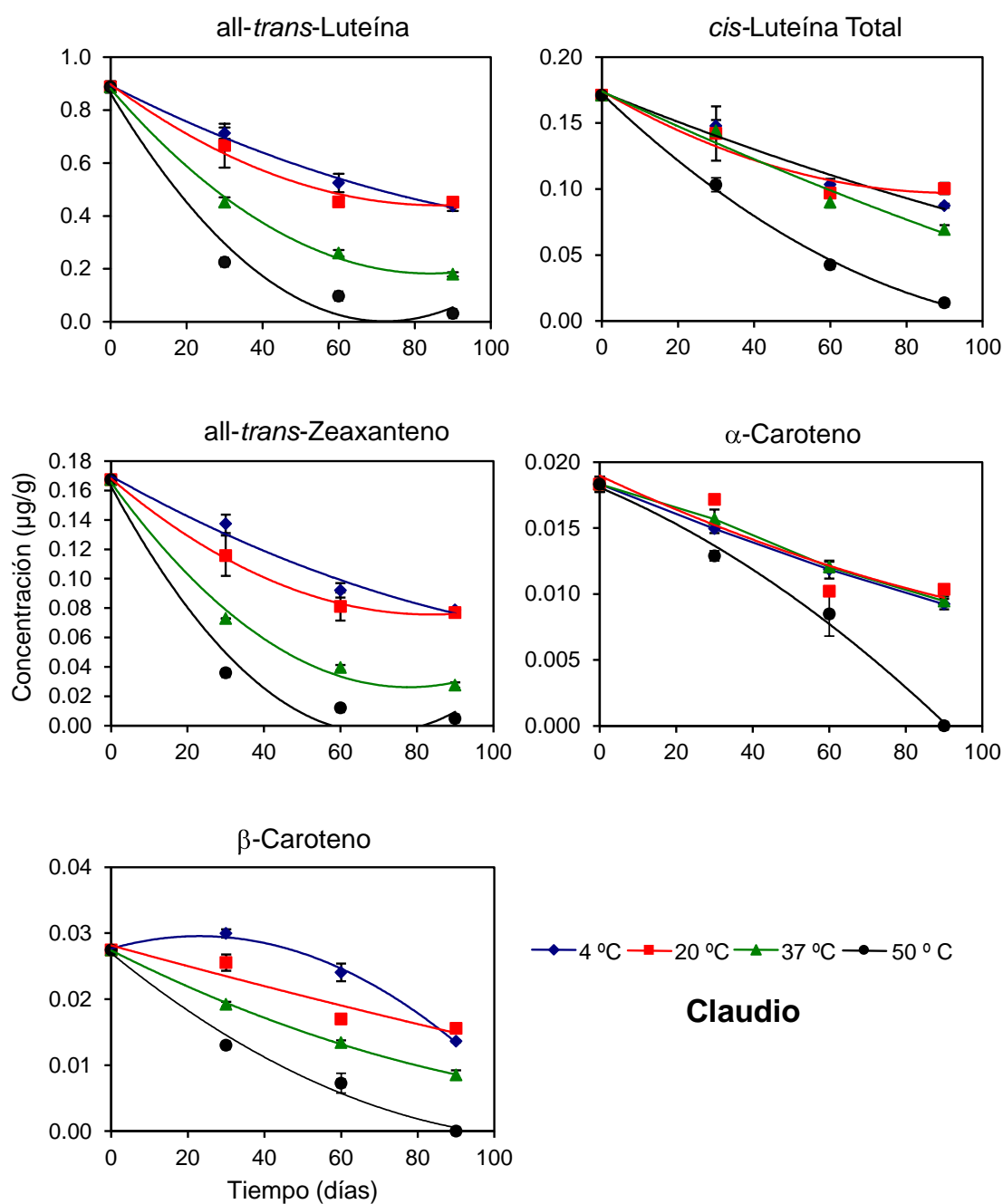
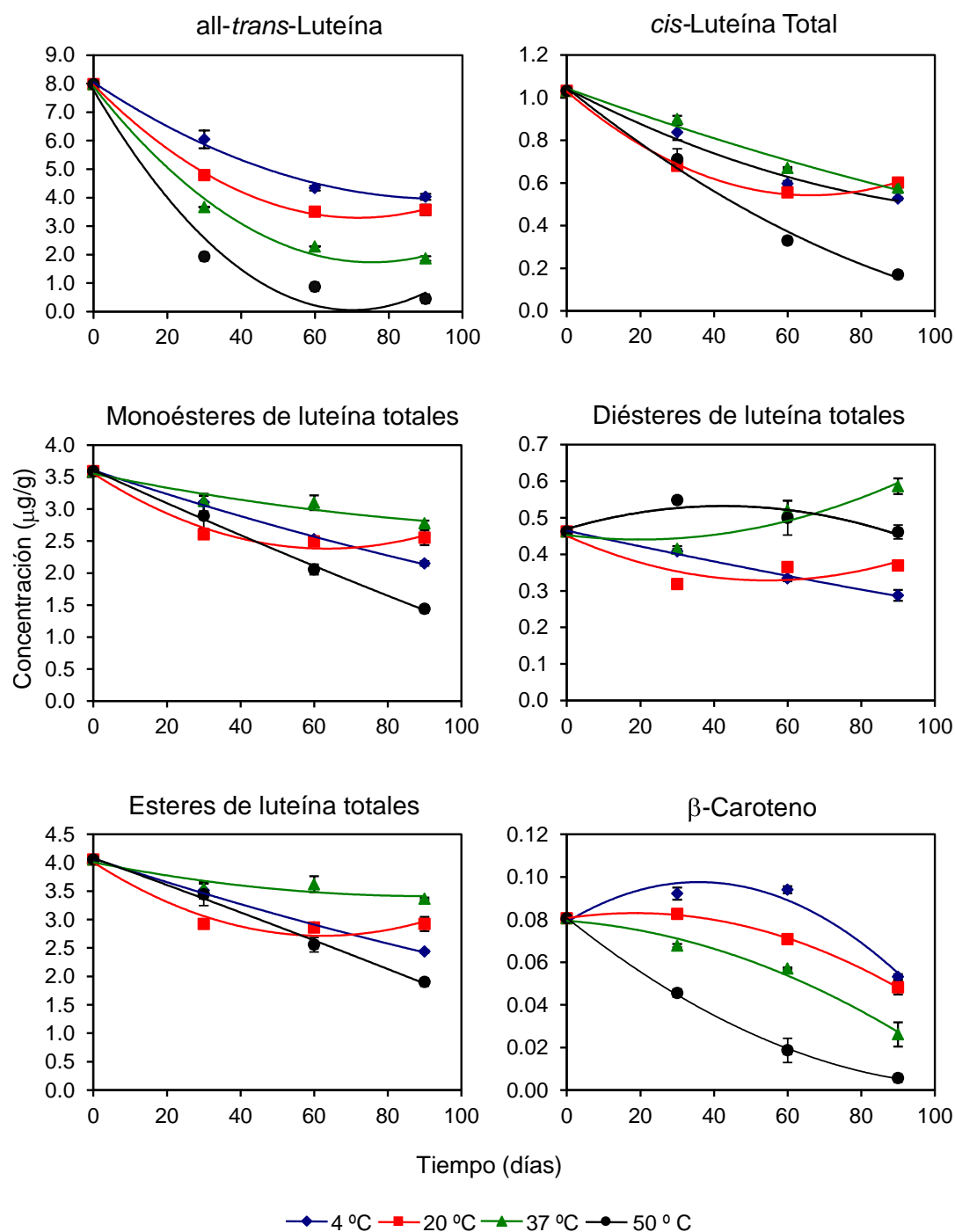
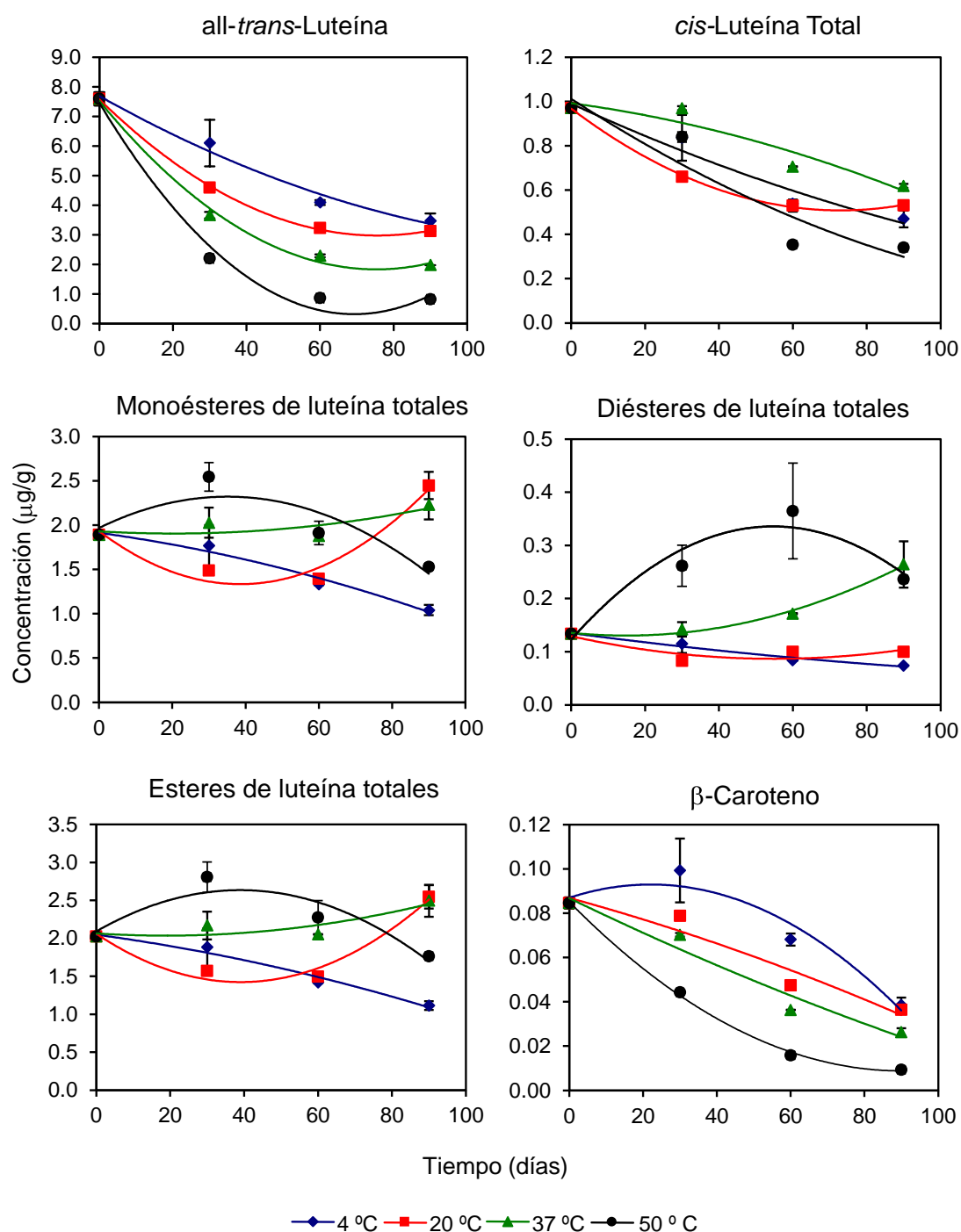


Figura 141. Evolución del contenido (μg/g) en carotenoides individuales (all-*trans*-zeaxanteno, all-*trans*-luteína, *cis*-luteína, α-caroteno y β-caroteno) presentes en la harina de la variedad Claudio de trigo duro, durante el almacenamiento a 4, 20, 37 y 50°C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de tres análisis.



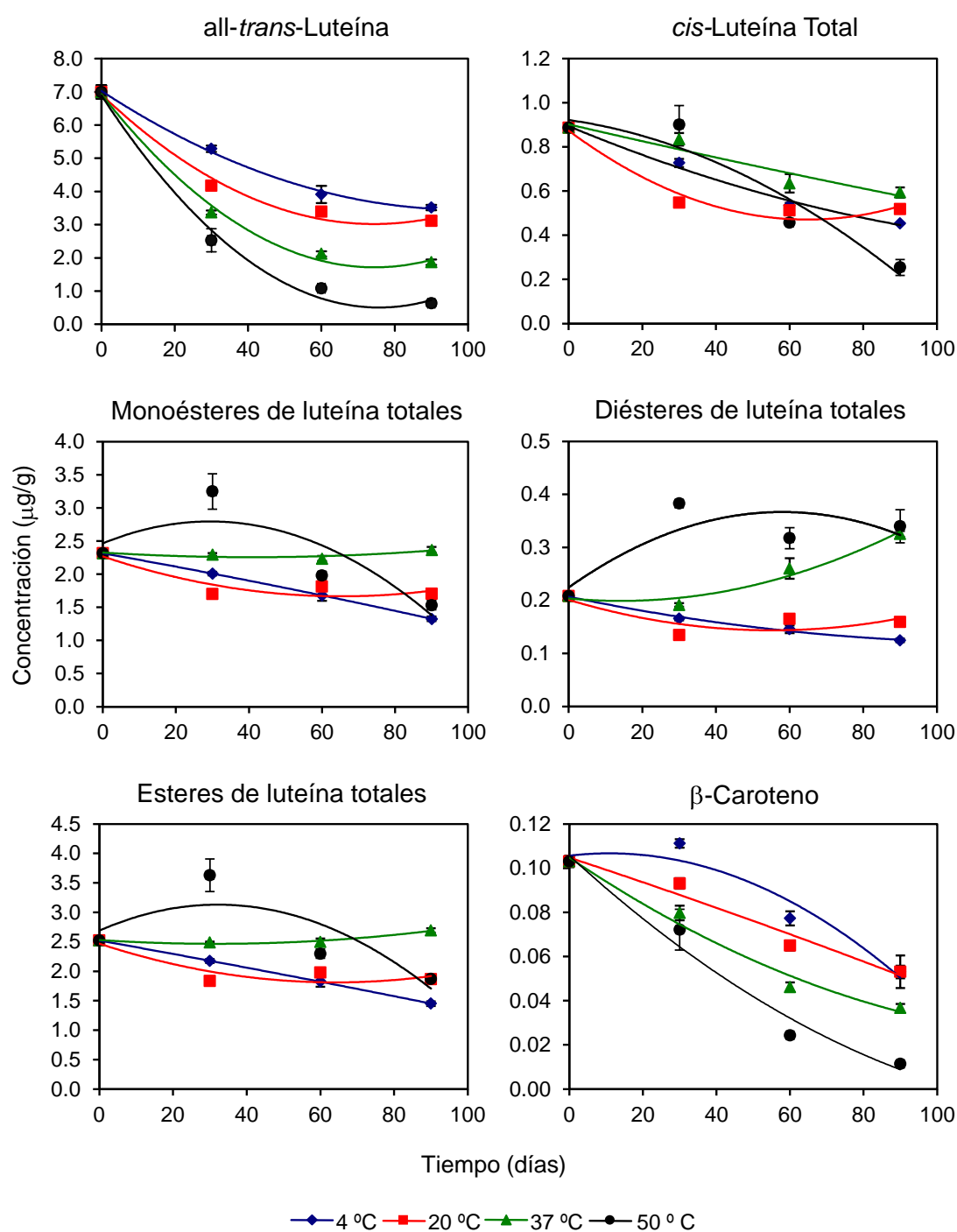
HT630

Figura 142. Evolución del contenido (μg/g) en carotenoides individuales (*all-trans*-luteína, *cis*-luteína y β-caroteno) y fracciones esterificadas de luteína (monoésteres, diésteres y ésteres totales) presentes en harinas de la línea HT630 de tritordeum, durante el almacenamiento a 4, 20, 37 y 50 °C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de tres análisis.



HT621

Figura 143. Evolución del contenido (μg/g) en carotenoides individuales (*all-trans*-luteína, *cis*-luteína y β-caroteno) y fracciones esterificadas de luteína (monoésteres, diésteres y ésteres totales) presentes en harinas de la línea HT621 de tritordeum, durante el almacenamiento a 4, 20, 37 y 50°C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de tres análisis.



HT609

Figura 144. Evolución del contenido (μg/g) en carotenoides individuales (*all-trans*-luteína, *cis*-luteína y β-caroteno) y fracciones esterificadas de luteína (monoésteres, diésteres y ésteres totales) presentes en harinas de la línea HT609 de tritordeum, durante el almacenamiento a 4, 20, 37 y 50 °C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de tres análisis.

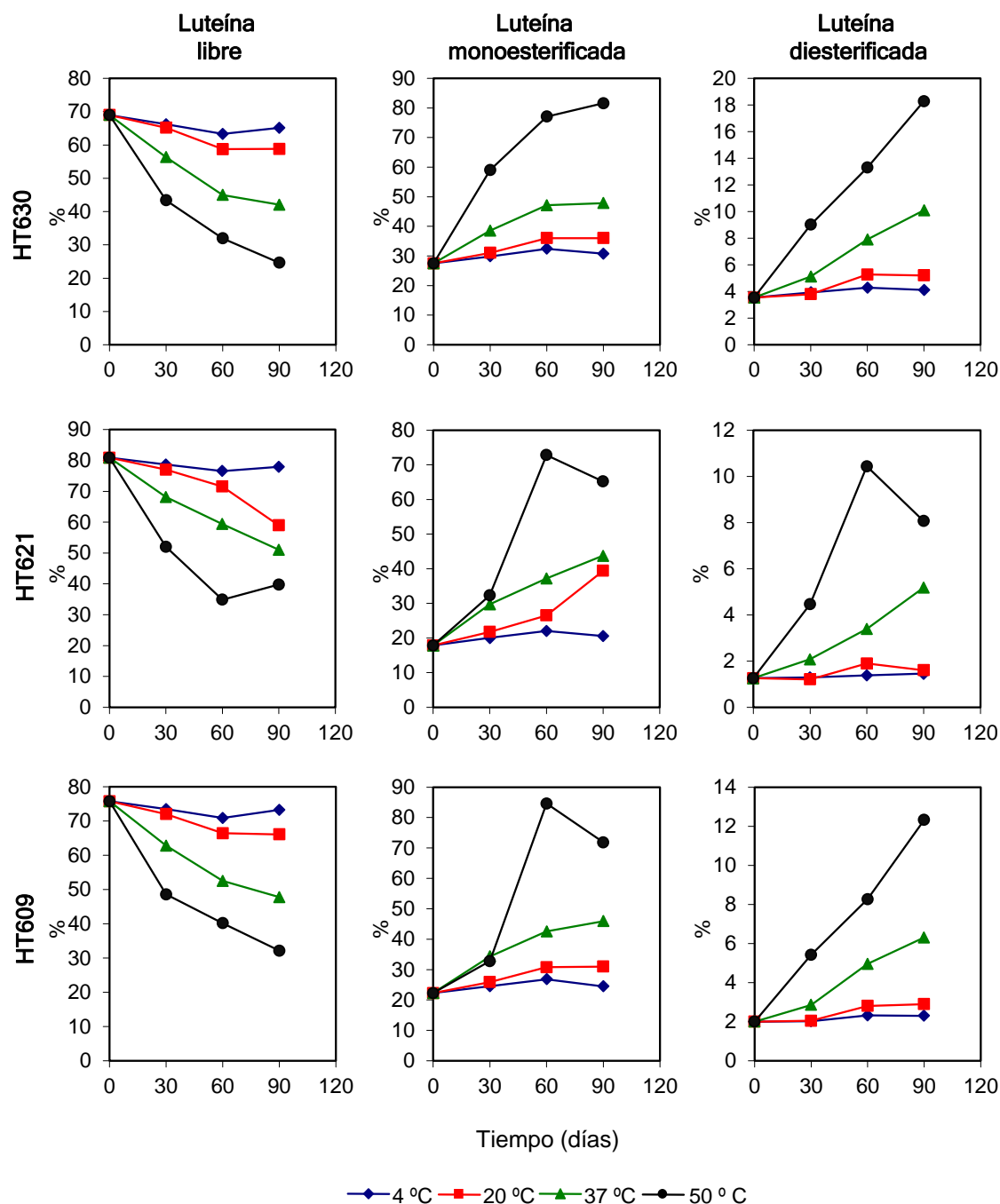
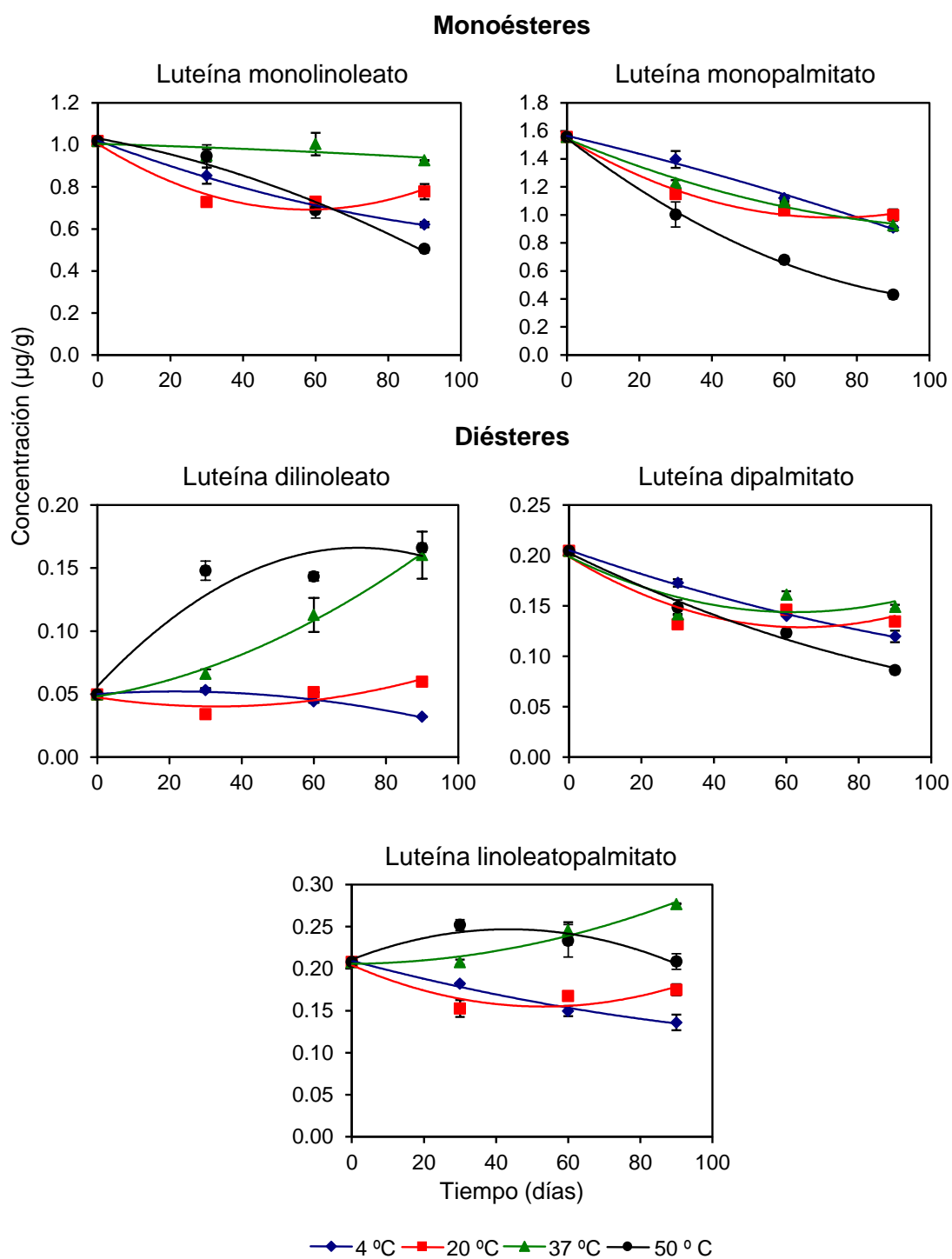
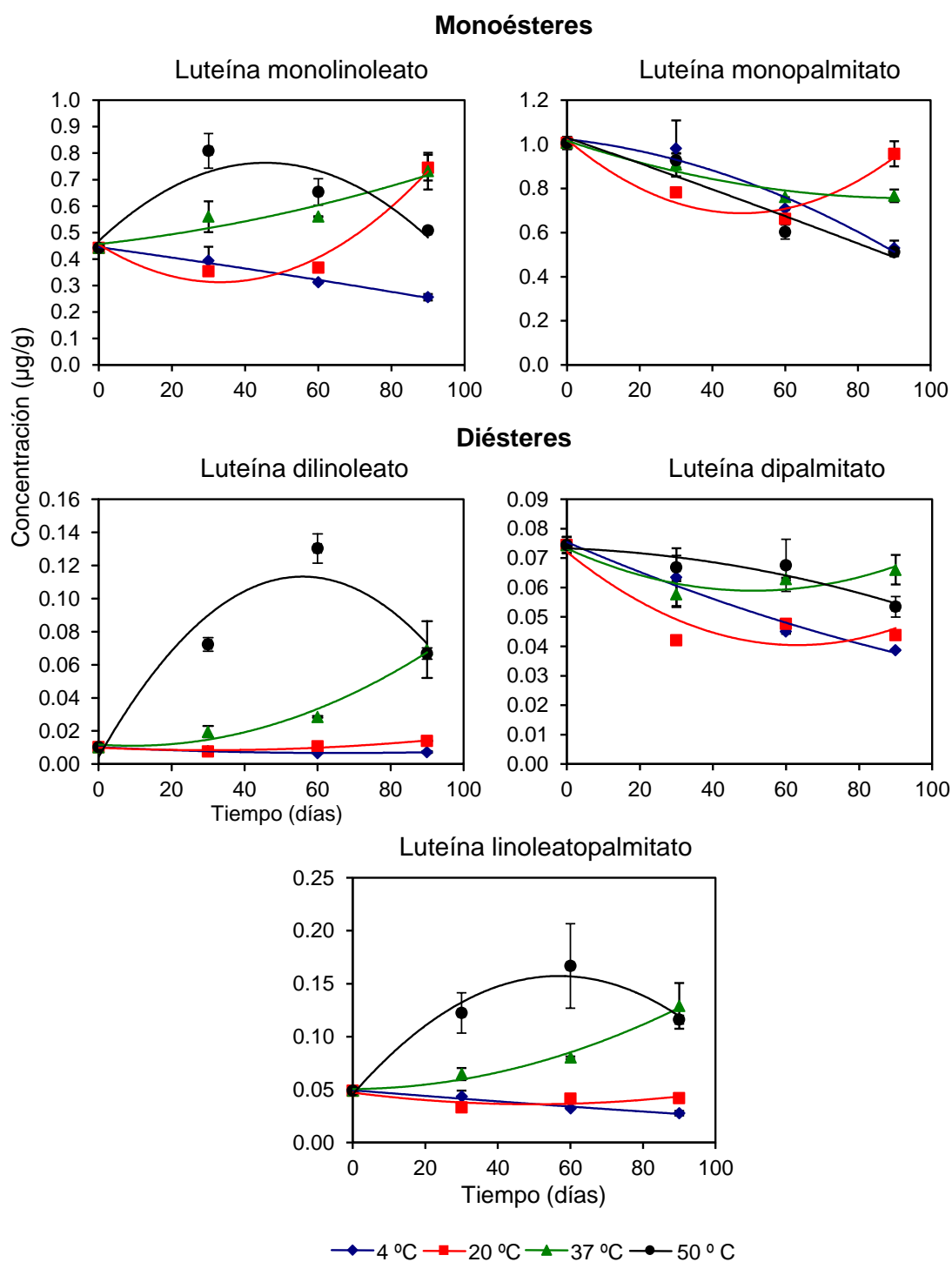


Figura 145. Efecto de la temperatura (4, 20 37 y 50°C) sobre el grado de esterificación de luteína durante el almacenamiento de harinas de tritordeum (líneas HT630, HT621, HT609). Para cada variedad, los datos expresan la contribución porcentual de cada fracción (libre, monoesterificada y diesterificada) en función de la temperatura y el tiempo de almacenamiento.



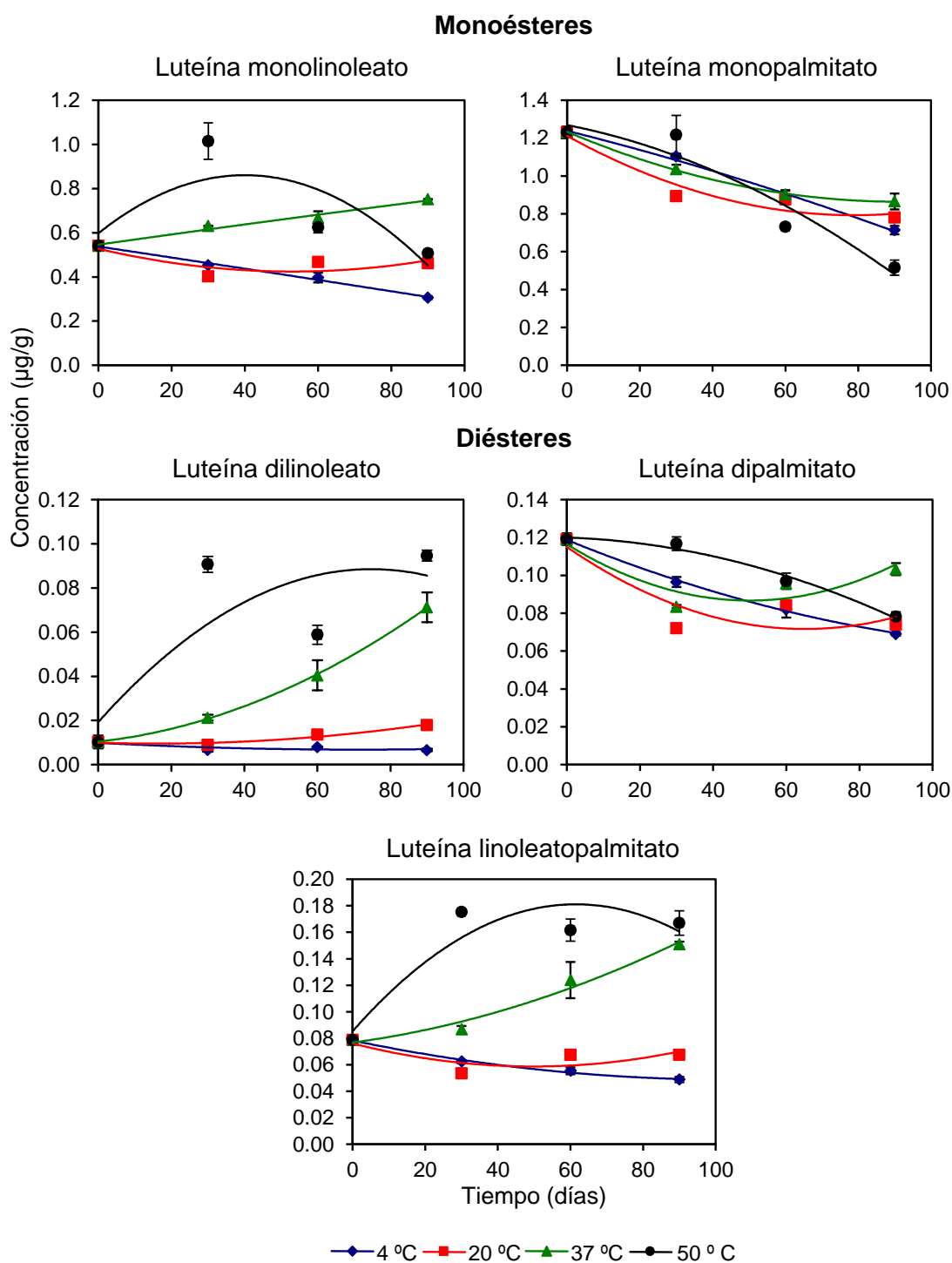
HT630

Figura 146. Evolución individual del contenido ($\mu\text{g/g}$) en monoésteres y diésteres de luteína presentes en la harina de la línea HT630 de tritordeum, durante el almacenamiento a 4, 20, 37 y 50°C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de tres análisis.



HT621

Figura 147. Evolución individual del contenido ($\mu\text{g/g}$) en monoésteres y diésteres de luteína presentes en la harina de la línea HT621 de tritordeum, durante el almacenamiento a 4, 20, 37 y 50°C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de tres análisis.



HT609

Figura 148. Evolución individual del contenido (µg/g) en monoésteres y diésteres de luteína presentes en la harina de la línea HT609 de tritordeum, durante el almacenamiento a 4, 20, 37 y 50°C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de tres análisis.

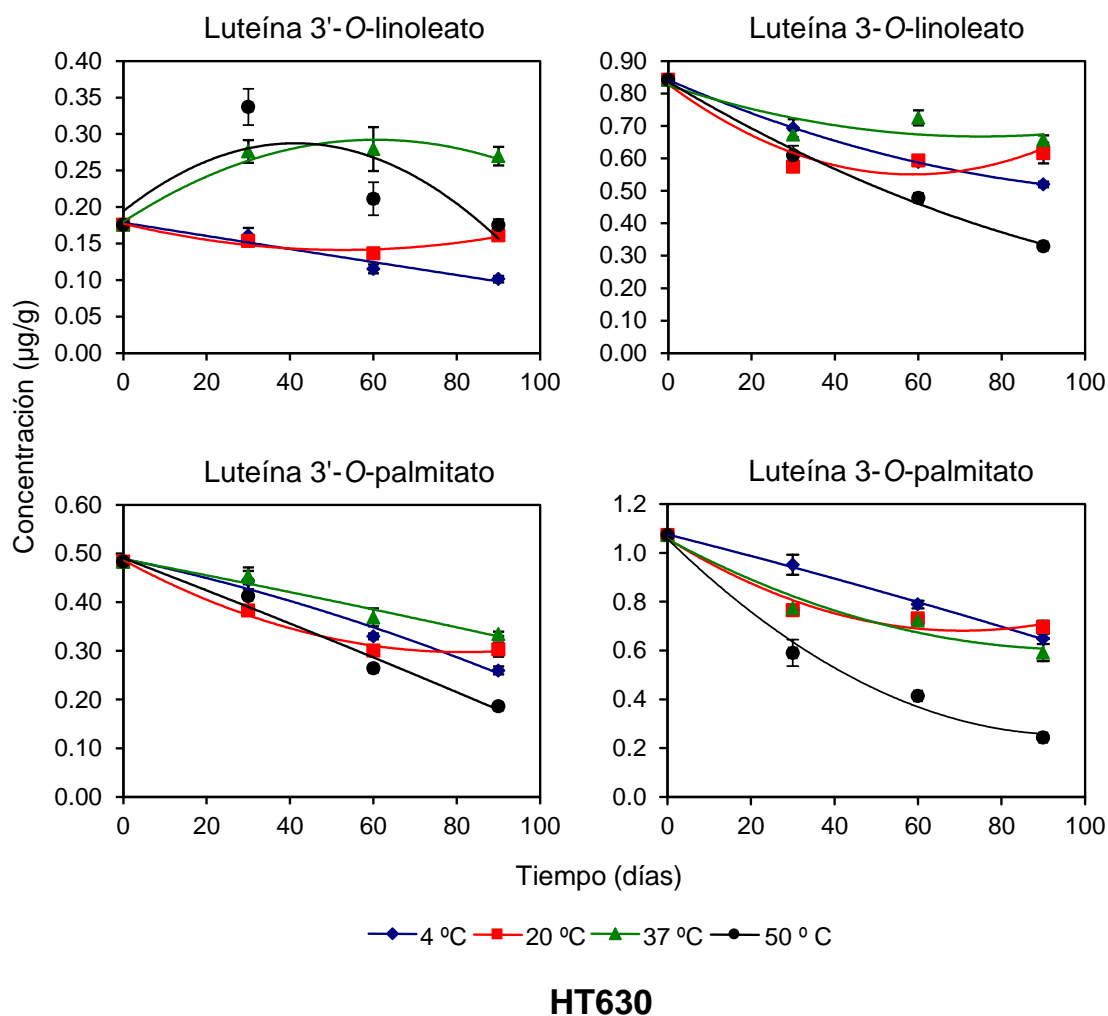


Figura 149. Cambios en el contenido de regioisómeros de luteína monolinoleato y luteína monopalmitato durante el almacenamiento de harinas integrales de tritordeum (HT630) a 4, 20, 37 y 50°C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de tres análisis.

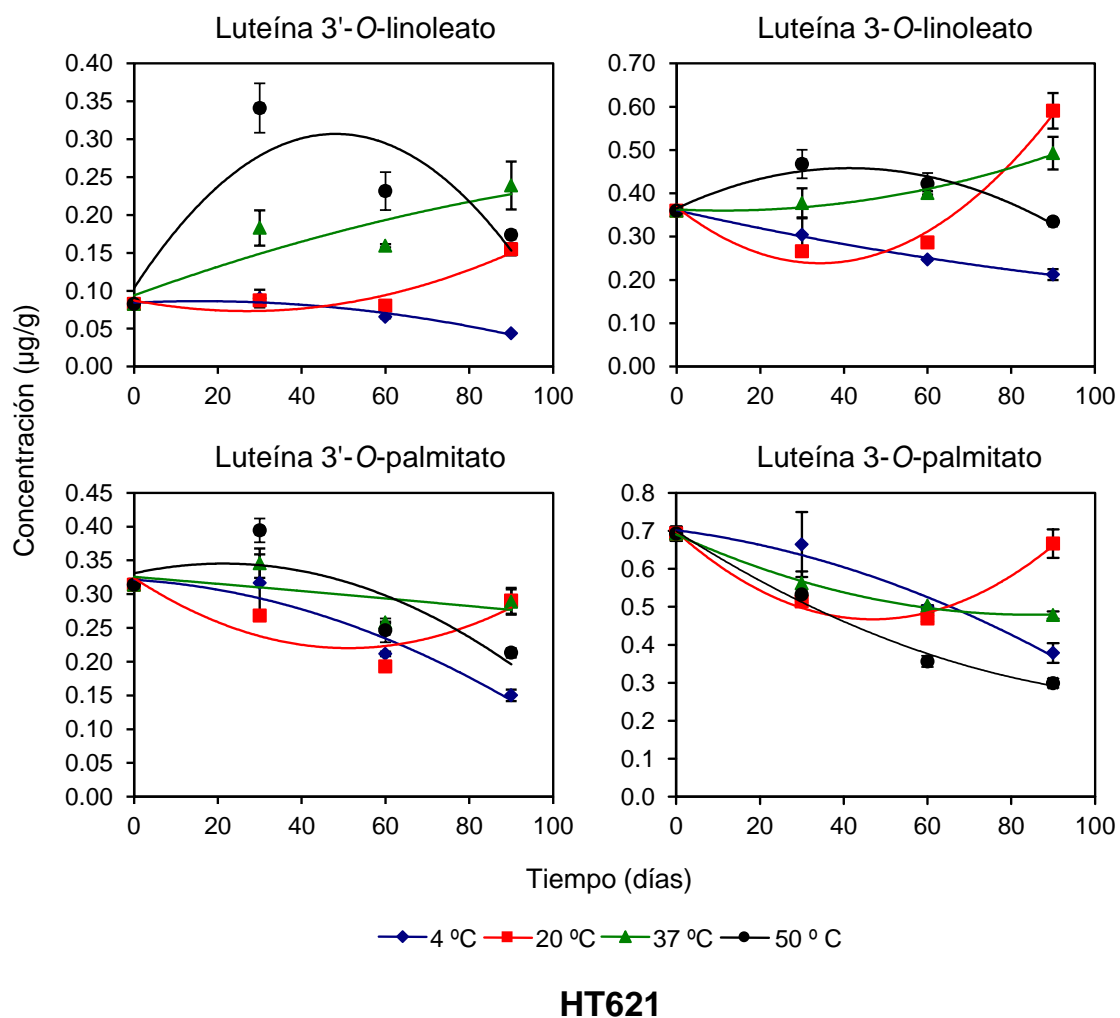


Figura 150. Cambios en el contenido de regioisómeros de luteína monolinoleato y luteína monopalmitato durante el almacenamiento de harinas integrales de tritordeum (HT621) a 4, 20, 37 y 50°C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de tres análisis.

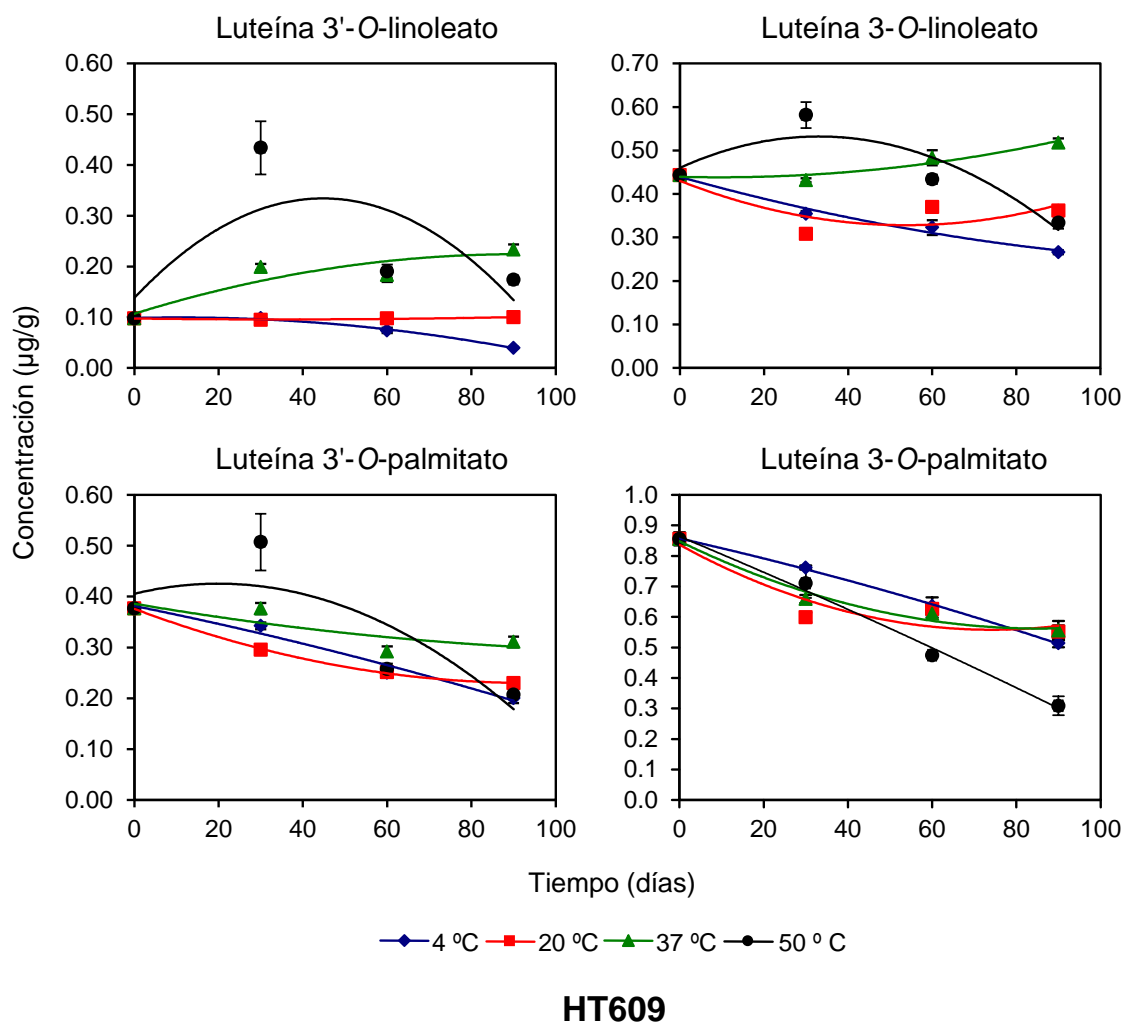


Figura 151. Cambios en el contenido de regioisómeros de luteína monolinoleato y luteína monopalmitato durante el almacenamiento de harinas integrales de tritordeum (HT609) a 4, 20, 37 y 50°C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de tres análisis.



5.9. Efecto del almacenamiento prolongado sobre el contenido y estabilidad de los pigmentos carotenoides presentes en granos y harinas integrales de trigo duro y tritordeum.

Las experiencias de almacenamiento que se describen a continuación tienen como objetivo valorar fenómenos de degradación termooxidativa de pigmentos carotenoides, así como la influencia de su estructura química en dicho proceso, bajo condiciones de temperatura controlada y tiempo prolongado. Esto permitirá contrastar los resultados y afianzar las conclusiones derivadas de las experiencias preliminares de almacenamiento en postcosecha. Para tal fin se seleccionó una variedad de trigo duro (Don Pedro) y una línea avanzada de tritordeum (HT621). Tanto los granos, como sus respectivas harinas, fueron expuestos durante un periodo de 12 meses a un amplio rango de temperaturas (-32, 6, 20, 37 y 50°C), incluyendo éste las condiciones habituales a las que los granos de cereal, y sus harinas, pueden estar sometidos en situaciones de almacenamiento a escala industrial. La comparación entre el comportamiento de los pigmentos en los granos y las harinas determinará la influencia y efecto del procesado sobre la estabilidad de los mismos en ambos cereales. Este trabajo aborda por primera vez el estudio detallado y a largo plazo de la estabilidad de los pigmentos carotenoides en tritordeum, el cual se complementa con el análisis de los parámetros cinéticos que caracterizan el proceso de degradación de pigmentos.

Tal y como se describió en la sección de *Materiales y Métodos*, las muestras de granos de cereal procedían de la colección del IAS-CSIC, habiendo estado conservadas a 4°C hasta el inicio de las experiencias y asegurando de este modo la total madurez de las mismas. Aunque se trata de las mismas variedades que fueron analizadas en las experiencias postcosecha, al provenir de otra campaña y condiciones de cultivo y almacenamiento éstas presentan diferencias cualitativas, y fundamentalmente cuantitativas, relativas a la composición de pigmentos carotenoides que serán descritas en el siguiente apartado. Dichas diferencias, como se ha introducido con anterioridad, no son más que un mero reflejo de la versatilidad del metabolismo de las semillas de cereales en cuanto a la adaptación a las prácticas de cultivo, condiciones climáticas, posterior almacenamiento, y del estado de madurez en la que éstas se encuentran (Chirinos *et al.*, 2007; Griffiths *et al.*, 2007).



5.9.1. Composición cualitativa y cuantitativa de pigmentos carotenoides en granos de trigos duros y tritordeum sometidos a almacenamiento prolongado.

La composición observada para ambos tipos de cereales se encuentra en consonancia con los datos anteriormente mostrados en la presente memoria, así como con estudios previos (Atienza *et al.*, 2007b), siendo el contenido medio en carotenoides totales cinco veces superior en tritordeum (línea HT621) con respecto a trigo duro (Don Pedro). En la **Tabla 25** se detalla la composición carotenoide de los granos sometidos a estudio.

El perfil encontrado en tritordeum no supone modificación alguna a lo anteriormente expuesto, siendo el pigmento mayoritario all-*trans*-luteína (4.18 µg/g), sus isómeros 9- y 13-*cis* (0.19 y 0.30 µg/g, respectivamente), así como las formas esterificadas de la misma (3.05 µg/g), dando cuenta del 99% del contenido en carotenoides totales. Adicionalmente, una pequeña proporción de β-caroteno (1%; 0.07 µg/g) estuvo presente. La fracción de luteína esterificada representó el 39.5%, siendo la fracción de monoésteres superior a la de diésteres. En la **Tabla 26** se muestra la composición relativa entre las formas libres y esterificadas para los granos de ambas especies de cereales. La **Tabla 27** detalla la composición porcentual de las fracciones de monoésteres (incluyendo los regioisómeros) y diésteres, así como los respectivos ratios correspondientes a los regioisómeros de los mismos (ratio 3/3'). Para ambos tipos de monoésteres los regioisómeros esterificados en posición 3 fueron los más abundantes. Con respecto a la fracción de diésteres cuya presencia fue solo atribuible a tritordeum, el mayoritario fue el diéster mixto luteína (luteína linoleatopalmitato) que alcanzó el 44%, seguido de luteína dipalmitato (42%) y por último luteína dilinoleato (14%). Con carácter general, podemos decir que dentro de ambos grupos, monoéster y diéster, fueron los pigmentos esterificados con ácido palmítico (C16:0) los más abundantes. La caracterización de la composición de regioisómeros del diéster mixto (luteína linoleatopalmitato) no pudo determinarse al realizar el análisis cromatográfico mediante el uso de fase reversa C₁₈.

Con respecto a los granos de trigo duro, estos sí presentaron diferencias frente a lo observado en el periodo postcosecha, apuntando como característica más relevante la presencia de monoésteres de luteína. No obstante, cabe señalar que esta fracción esterificada representó tan solo 3.2% del contenido carotenoide total, no alcanzando la tasa de esterificación que presenta tritordeum (**Tabla 26**). La existencia en este caso de ésteres estaría indicando que no solo el componente genético es determinante del perfil carotenoide, sino que el factor ambiental también lo es, en particular las condiciones y el tiempo de almacenamiento junto con el estado de madurez de los granos (Kaneko *et al.*, 1995; Hidalgo *et al.*, 2009a). En determinados frutos como es el caso del pimiento se ha



observado un incremento en el grado de esterificación de las xantofilas durante los procesos de maduración (Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez, 1994b). Como es habitual en cereales, all-*trans*-luteína constituyó el pigmento mayoritario, representando el 92% del contenido total de carotenoides (1.11 µg/g), seguido de all-*trans*-zeaxanteno en un 6% (0.08 µg/g) y finalmente all-*trans*-β-caroteno en un 2% (0.02 µg/g) (Tabla 25). Como aspecto también diferenciador, se debe apuntar que no fue posible llevar a cabo una cuantificación de all-*trans*-α-caroteno, debido no solo a los bajos niveles presentes en las muestras, sino también a la coelución con monoésteres de luteína en esa zona del cromatograma. La composición porcentual de los correspondientes regioisómeros de monoéster en las muestras de trigo (Tabla 27), indicó también una abundancia de luteína monopalmitato frente a luteína monolinoleato, así como la presencia tres veces superior de luteína-3-*O*-palmitato con respecto a luteína-3'-*O*-palmitato.

5.9.2. Evolución del contenido y composición de pigmentos carotenoides durante el almacenamiento prolongado de granos de trigo duro y tritordeum.

El análisis de los pigmentos carotenoides totales, libres más esterificados, en los granos de ambos tipos de cereales, trigo duro (Don Pedro) y tritordeum (HT621), resultó ser bastante similar y concordante con otros estudios de estabilidad de carotenoides en alimentos, en los que se aborda el estudio de xantofilas libres y esterificadas (Schweiggert *et al.*, 2007). La Figura 152 representa la evolución del contenido carotenoides total durante el almacenamiento prolongado de ambos cereales. La Tabla A27 del Anexo incluye los valores medios y el error estándar para cada cereal junto con el análisis de significación estadística (test de Duncan, $p < 0.05$). Las variables impuestas, temperatura y tiempo, afectaron claramente sobre el contenido global de pigmentos, produciéndose una disminución progresiva y cada vez más acusada conforme aumentaron ambas. Sin embargo, la comparación entre ambos tipos de cereales permite advertir, en una primera aproximación, un comportamiento más estable de los pigmentos en tritordeum. Las pérdidas al final del almacenamiento a las temperaturas de -32, 6 y 20°C fueron similares en ambos cereales, mientras que las atribuidas a las dos temperaturas superiores, 37 y 50°C, si mostraron diferencias. Así, en los granos mantenidos a 50°C se alcanzaron valores del 99 y 77% de pérdida de pigmentos para trigo duro y tritordeum, respectivamente, al final del periodo de almacenamiento. Además, cabe señalar que la desaparición casi total (99%) de pigmentos en los granos de trigo duro conservados a 50°C fue observada a partir del décimo mes, mientras que en las mismas condiciones los granos de tritordeum aún mantienen el 19% del contenido inicial de pigmentos. En la Figura 153 se muestra el



registro de temperaturas impuestas durante el periodo de almacenamiento. La **Figura 154** describe la evolución de los perfiles cromatográficos que se obtuvieron para granos de tritordeum y trigo duro durante el almacenamiento de doce meses.

La existencia ésteres de luteína (monoésteres) en los granos de trigo duro empleados en este experimento permitió realizar una comparación entre el comportamiento de las formas libres y las esterificadas a lo largo del periodo de almacenamiento. No obstante, se debe indicar de nuevo que la tasa de esterificación de luteína en trigo duro no es comparable a la de tritordeum, siendo del orden de unas 12 veces superior en este último (**Tabla 26**). En cualquier caso este aspecto permitirá una mayor confirmación de la estabilidad que confiere la esterificación a los pigmentos carotenoides y será abordado a continuación.

La evolución de los pigmentos carotenoides libres individuales (**Figura 155**) siguió la misma pauta descrita para el contenido carotenoides total, los cuales desaparecieron por completo a partir del décimo mes de almacenamiento a 50°C. La **Tabla A28** del *Anexo* incluye los valores medios, el error estándar y el análisis de significación estadística (test de Duncan, $p < 0.05$). Las temperaturas -32 y 6°C presentaron un comportamiento similar para todos los pigmentos, constituyendo las condiciones térmicas más suaves del almacenamiento. Esta similitud resulta contradictoria ya que las pérdidas a -32°C eran esperables que fueran menores. Un efecto similar ha sido descrito Craft y Wise (1993), los cuales no encuentran diferencias significativas en la concentración de luteína cuando las muestras fueron almacenadas a -80, -20 y 4°C durante el mismo periodo de tiempo. El registro de temperaturas a lo largo del experimento (**Figura 153**) indica que ambas temperaturas, al igual que el resto, no experimentaron fluctuaciones que pudieran estar repercutiendo en tales resultados. En general la estabilidad de los pigmentos carotenoides, bien en extractos concentrados o formando parte del propio alimento, aumenta con el descenso de la temperatura siendo (Craft y Wise, 1993; Britton y Khachik, 2009; Cerón-García *et al.*, 2010). Para el caso de *all-trans*-luteína, transcurrido el periodo de almacenamiento, se registraron descensos a -32 y 6°C del 24 y 28%, respectivamente, y de manera análoga las pérdidas de *all-trans*-zeaxanteno a ambas temperaturas fueron del 21 y 25%, respectivamente. En concordancia con lo observado para carotenoides totales, la degradación fue más acusada a 37 y 50°C, con valores del 79% para *all-trans*-luteína y del 62% para *all-trans*-zeaxanteno al final del periodo de almacenamiento. Únicamente a 50°C se observó la desaparición total para dichos pigmentos. Con respecto a los pigmentos minoritarios, β -caroteno presentó descensos similares para todas las temperaturas ensayadas a los indicados para los dos pigmentos más abundantes, a excepción la pérdida del 10% registrada a -32°C. Los isómeros *cis* de luteína, al igual que se observó en el



periodo postcosecha de los granos, experimentaron mermas más amortiguadas al estar favorecida la isomerización *cis-trans* con la temperatura. La isomerización geométrica es junto con la oxidación, por vía enzimática y no enzimática, las principales alteraciones que afectan a los pigmentos carotenoides cuando éstos son expuestos a tratamientos térmicos o durante el almacenamiento y procesado de los alimentos. Este aspecto está ampliamente recogido en la literatura (Shi y Le Maguer, 2000; Marx *et al.*, 2003; Pott *et al.*, 2003; Aman *et al.*, 2005a; Schieber y Carle, 2005; Britton y Khachik, 2009), cobrando especial atención los estudios sobre isomerización *cis/trans* de licopeno y β -caroteno debido a las propiedades antioxidantes del primero y al carácter de provitamina A del segundo. Los trabajos sobre isomerización *cis/trans* de otros carotenoides como luteína y zeaxanteno son cada vez más patentes debido al papel de éstos en la prevención de enfermedades oculares (Humphries y Khachik, 2003; Updike y Schwartz, 2003; Aman *et al.*, 2005a), aunque los análisis de cereales siguen siendo bastantes escasos a tal efecto.

Respecto a la evolución de las formas monoesterificadas de luteína, se observó un comportamiento claramente diferenciado al de los pigmentos libres conforme progresó el almacenamiento (**Figura 155**), el cual pueden ser atribuidos a la propia naturaleza de la esterificación. El estado físico en el que se encuentran los carotenoides dentro de la matriz alimentaria y la naturaleza de la misma (Britton *et al.*, 2002), junto con la estructura química que presentan (Pérez-Gálvez y Mínguez-Mosquera, 2002a; Schweiggert *et al.*, 2007; Mertz *et al.*, 2010) son dos factores determinantes del comportamiento y estabilidad de los mismos durante el almacenamiento o procesado de los alimentos. El análisis de monoésteres resultó complejo debido a los bajos niveles de dichos pigmentos en las muestras de trigo duro, aunque permite visualizar unas tendencias generales hacia unas pérdidas menos acusadas y más amortiguadas, existiendo un comportamiento similar entre las temperaturas -32, 6, 20 y 37°C, y registrándose finalmente a la temperatura de 50°C descensos del 75% al final del almacenamiento que contrastan con el 100% observado para los pigmentos libres. Esto confirma el papel protector que ejerce la esterificación sobre los pigmentos con respecto a la temperatura lo que repercute en una mayor retención de los mismos con el transcurso del tiempo, existiendo al final del almacenamiento y para las condiciones térmicas más extremas solo presencia de monoésteres de luteína en las muestras de trigo duro. El comportamiento a 37°C fue muy llamativo, sugiriendo el concurso de dos procesos claramente diferenciados y contrapuestos, biosíntesis y degradación. La competencia entre ambos hace que el efecto resultante sea una amortiguación de los fenómenos degradativos, produciéndose pérdidas de tan solo el 25% para dicha temperatura. Los fenómenos sintéticos fueron ya observados y descritos anteriormente en los experimentos de almacenamiento en postcosecha de granos de



tritordeum, manifestándose como aumentos de luteína esterificada a expensas de la libre, siendo éstos muy acusados a 37°C al final de tres meses de almacenamiento. Durante almacenamientos y tratamientos postcosecha de los frutos, en especial durante las primeras etapas, es habitual observar aumentos manifiestos del contenido de carotenoides y sus ésteres, siendo este fenómeno dependiente del estadio de desarrollo y maduración de los frutos. Este efecto ha sido previamente descrito por otros autores en cultivos como patata y otros tubérculos (Morris *et al.*, 2004; Chirinos *et al.*, 2007; Griffiths *et al.*, 2007), judías verdes (Monreal *et al.*, 1999), melocotón (Caprioli *et al.*, 2009), etc. Los datos obtenidos permiten corroborar que el proceso de esterificación es un proceso modulado por la temperatura a la vez que se apunta a la temperatura 37°C (de las ensayadas) como una temperatura clave en tal proceso en la que la reacción de esterificación parece acelerarse. La temperatura es un factor relevante que influye de manera relevante en la biosíntesis y metabolismo de los carotenoides (Gross, 1987). La **Figura 156** muestra la evolución del contenido relativo de las formas libres y esterificadas durante el almacenamiento prolongado de los granos de trigo duro, siendo concordante con lo descrito anteriormente.

Con respecto a tritordeum el análisis de los pigmentos en estado, tanto libre como esterificado, fue similar a lo comentado anteriormente para trigo duro, siguiendo el mismo patrón degradativo en función de la temperatura (**Figura 157**). La **Tabla A29** del *Anexo* incluye los valores medios y error estándar, junto con el análisis de significación estadística (test de Duncan, $p < 0.05$). No obstante, destacar que los efectos a 50°C, para los carotenoides libres en los últimos meses del almacenamiento (meses 10 a 12), no fueron tan acusados con respecto a los observados en trigo duro. Una excepción lo constituyó β -caroteno, que solo pudo ser cuantificado hasta el séptimo mes. Esto podría indicar que β -caroteno es un carotenoide más termolábil que *all-trans*-luteína. Este dato es consistente con otros trabajos en los que se indica a α - y β -caroteno, junto con licopeno, como pigmentos más sensibles a las condiciones de almacenamiento o procesos termooxidativos, advirtiendo una diferencia de estabilidad en función de la estructura del carotenoide (Henry *et al.*, 1998; Tang y Chen, 2000). Los isómeros *cis*- nuevamente reflejaron, dentro del conjunto de pigmentos libres, los descensos más suaves con respecto a las temperaturas -32, 6, 20 y 37°C. El comportamiento de dichos pigmentos, a ésta última temperatura, es destacable registrándose pérdidas de tan sólo del 46%. Se visualizaron además aumentos transcurrido el primer mes a 37 y 50°C, concordantes con la tasa de isomerización *cis-trans* promovida por el efecto de tratamientos térmicos como el que se describe.

La fracción de luteína monoesterificada en tritordeum es una fracción intermedia entre el estado libre y el completamente esterificado (diéster) de la molécula. Las pérdidas



registradas para esta fracción a 37 y 50°C fueron superiores a las observadas para trigo duro, siendo del 41 y 86%, respectivamente, consecuencia no sólo de las condiciones degradativas sino más bien de la transformación de éstos en diésteres, al menos a temperaturas moderadas (incluyendo 37°C). Con respecto al análisis de éstos últimos, se puede visualizar una mayor estabilidad en relación a las formas monoesterificadas, tal y como se deduce de las pérdidas al final del almacenamiento a 50°C, siendo las más bajas que se registraron del orden del 60%. La mayor estabilidad de los carotenoides conforme aumenta el grado de esterificación de los mismos ha sido apuntada en diversos estudios (Khachik y Beecher, 1988; Subagio *et al.*, 1999). La reducción en los valores de las tasas de pérdidas asociada a aumentos de temperatura apunta de nuevo a que el proceso de esterificación sigue activo en los granos al menos en los primeros meses de almacenamiento. El progreso del contenido relativo (%) de las fracciones de luteína libre, monoesterificada y diesterificada (**Figura 156**) durante el almacenamiento prolongado de granos de tritordeum resume el análisis expuesto, y pone de manifiesto la modulación del proceso de esterificación con la temperatura.

5.9.2.1. Evolución y estabilidad de las fracciones de luteína esterificadas durante el almacenamiento prolongado de granos de trigo duro y tritordeum.

Al igual que en las experiencias de almacenamiento corto de granos en postrecolección, los resultados obtenidos, en relación a las fracciones esterificadas totales, establece la necesidad de abordar el estudio de éstas de una manera más exhaustiva. El análisis de las fracciones de luteína esterificadas en trigo duro evidenció diferencias en el comportamiento a lo largo del almacenamiento atendiendo al tipo de ácido graso y a la posición que éste ocupe en la molécula de luteína (posiciones 3 y 3'). Los niveles de luteína monolinoleato (**Figura 158**) se mantuvieron prácticamente constantes en el rango de temperaturas de -32 a 37°C. A 50°C las pérdidas resultaron ser sólo del 56%. El perfil grafico mostrado reveló síntesis neta de dicho monoéster al inicio del almacenamiento, para todas las temperaturas ensayadas, excepto para 50°C, fenómeno que apoya las bajas pérdidas descritas. Luteína monopalmitato experimentó, por el contrario, pérdidas mayores y en aumento con la temperatura, alcanzando valores del 95% a 50°C (**Figura 158**). Esto implica una diferencia de estabilidad entre las dos formas monoesterificadas, siendo mayor para el caso de luteína monolinoleato. La disminución de la relación entre ambos monoésteres conforme incrementó el tiempo y la temperatura (**Figura 159**) también apunta en este sentido. Esta discrepancia de estabilidad podría estribar en las diferencias estructurales que ambos ácidos grasos presentan, es decir la longitud de la cadena mayor,



para el linoléico (C18:2) y la presencia también en este último de dos insaturaciones en configuración *cis*, traducándose en una conformación en el espacio diferente. Estas características estructurales distan también de las presentadas por los carotenoides al portar éstos una cadena de polieno con casi exclusivamente dobles enlaces conjugados en configuración *trans*, lo que implica que son moléculas con una estructura rígida sin posibilidad de torsión (Skibsted, 2012). En las células vegetales, y debido a su carácter hidrofóbico, los carotenoides se encuentran asociados a proteínas (por ejemplo en las membranas fotosintéticas de los cloroplastos) o almacenados en el interior de estructuras lipoproteicas específicas (por ejemplo en los plastoglobulos de los cromoplastos) (Vishnevetsky *et al.*, 1999). Este cambio en la conformación espacial adoptado gracias a la unión del ácido graso poliinsaturado podría estar favoreciendo una mayor capacidad de interacción del carotenoide con su ambiente molecular, imprimiéndole más flexibilidad a la molécula, integrándolo más eficientemente en dichas estructuras subcelulares. Por lo tanto el grado de saturación del ácido graso parece ser un factor importante. Estos resultados, aunque en parte contradictorios debido a las reacciones de oxidación que deben de tener lugar, en las que los ácidos grasos con insaturaciones son más susceptibles (Biacs, *et al.*, 1989), no son sin embargo tan aislados existiendo trabajos pioneros, como los de Carnevale *et al.* (1979), en los que observan una mayor estabilidad de β -caroteno en presencia de ácido linoleico comparado con ácido láurico (C12:0) y oleico (C18:1).

El análisis a nivel de los correspondientes regioisómeros de ésteres de luteína encontrados en los granos de trigo duro está en consonancia con lo descrito anteriormente para las fracciones totales de éstos (**Figura 160**). Para ambos monoésteres, la forma esterificada en la posición 3 resultó ser más abundante, manteniéndose el ratio entre ambos regioisómeros constante a lo largo del periodo de almacenamiento (**Figura 159**). Esta diferencia resulta ser más acusada para los regioisómeros con ácido palmítico, en los que el ratio 3/3' se encontró, en todo momento, en el rango de 2.5-3.0. Para los regioisómeros de luteína esterificada con ácido linoléico, las pérdidas al final del almacenamiento indicaron diferencias en el comportamiento, lo que implicaría que ambas posiciones no tienen estabilidades equivalentes. Para las cuatro primeras temperaturas, las pérdidas de luteína-3'-*O*-linoleato son mayores a las de luteína-3-*O*-linoleato que incluso registra aumentos. A 50°C, en términos de estabilidad, fue la posición 3' la que se mostró más favorable indicando pérdidas menores que la posición 3. Esto indica que la especificidad de la actividad de la enzimas XAT por la posición 3 del anillo β - si es susceptible e incrementada por la temperatura, al menos para las condiciones ensayadas, y que es la posición 3' en cambio la más estable. Los regioisómeros correspondiente a los



monoésteres con ácido palmítico mostraron un comportamiento similar sugiriendo que para este caso ambas posiciones resultan ser equivalentes (**Figura 160**).

En el caso de los granos de tritordeum las diferencias de estabilidad atribuidas en función del ácido graso involucrado en cada monoéster no se manifestaron tan relevantes, aunque atendiendo a las temperaturas más elevadas, 37 y 50°C, si se intensificaron (**Figuras 159 y 161**). A 37°C las pérdidas registradas para el monoéster con linoleico fueron del 26% frente al 50% para palmítico al final del periodo ensayado. Nuevamente fueron los regioisómeros en posición 3 los más abundantes siendo para linoleico unas 5 veces superior con respecto a los ésteres en posición 3', aunque dicha proporción se vio reducida al final del periodo de almacenamiento y en especial a las temperaturas más elevadas (**Figura 159**). Diferencias de estabilidad con respecto a los regioisómeros con linoleico se manifestaron claramente a 37 y 50°C, produciéndose descensos para luteína-3-*O*-linoleato del 30 y 86%, respectivamente, mientras que para luteína-3'-*O*-linoleato fueron de 10 y 62%, respectivamente (**Figura 162**). El comportamiento indicado en este caso a 37°C dista del observado anteriormente para trigo duro, probablemente no debido a un cambio en la especificidad enzimática por la posición 3, sino a la síntesis de diésteres que acontece de manera simultánea y concatenada. Esto permite establecer que la secuencia de síntesis de los diésteres con ácido linoleico se produce con mayor tasa y/o selectividad a partir del monoéster luteína-3-*O*-linoleato. En el caso de los regioisómeros de los monoésteres con ácido palmítico dicha relación no experimentó cambios acusados, apuntando de nuevo la igualdad de ambas posiciones. Estas diferencias de estabilidad se reflejaron incluso en términos cinéticos y será comentado más adelante. Las diferencias estructurales entre ambos ácidos grasos, podría estar influyendo en estas diferencias de estabilidad, en este caso atribuidas en función de la posición que ocupen en la molécula de luteína. El conjunto de diésteres (**Figura 161**) reflejó claramente los fenómenos competitivos entre síntesis y degradación puestos de manifiesto durante el transcurso del almacenamiento, como así lo indicaron los aumentos en el contenido de luteína dilinoleato y luteína linoleatopalmitato con la temperatura. Esto confirma la mayor estabilidad que confiere el ácido linoléico frente al palmítico, así como la tasa de síntesis, intensificada al principio del almacenamiento a 37 y 50°C.

Estos datos, junto con los que se desprenden del análisis cinético que se describirá a continuación, permiten analizar la estabilidad del pigmento no solo a nivel de la fracción esterificada total sino también a nivel de regioisómeros, lo que aporta una información valiosa desde el punto de vista estructural que podría contribuir a un mejor conocimiento de la ruta bioquímica de esterificación de carotenoides, la cual todavía no está descrita.

La mayoría de los estudios realizados con carotenoides encaminados a valorar la estabilidad de los mismos están realizados en sistemas modelos y habitualmente con carotenoides puros (Shi y Chen, 1997; Chen y Tang, 1998; Henry *et al.*, 1998; Tang y Chen, 2000). Aunque en dichos sistemas modelo luteína resulta tener una mayor estabilidad que otros carotenoides, se debe tener en cuenta que no se trata de la situación y del ambiente normal que rodea a la molécula carotenoide en la matriz natural (Aman *et al.*, 2005b; Calvo, 2005). Las diversas matrices alimentarias son complejas, existiendo interacciones con otras moléculas presentes como proteínas, lípidos y carbohidratos. Dichas interacciones pueden resultar tanto en un efecto prooxidante como antioxidante (Walter y Purcell, 1974; Arya *et al.*, 1982). Factores como el medio que rodee al pigmento, así como el estado físico de éste dentro de la matriz alimentaria, los cuales repercuten en la biodisponibilidad y absorción de carotenoides por los consumidores (Britton *et al.*, 2002; Pérez-Galvez y Mínguez-Mosquera, 2005), no pueden ser fácilmente evaluados en sistemas modelos. En este sentido estos datos no se deben considerar nunca fácilmente extrapolables al alimento aunque pueden arrojar datos de interés. La necesidad de trabajos en los que se analiza la estabilidad de carotenoides formando parte del propio alimento, como el presente, se hacen por tanto muy necesarios.

5.9.2.2. Estudio cinético de la evolución del contenido y composición de pigmentos carotenoides durante el almacenamiento prolongado de granos de trigo duro y tritordeum.

La velocidad de la reacción de degradación de carotenoides fue evaluada realizando ajustes tanto para una cinética de orden 0 como de primer orden (orden 1) sobre los datos experimentales de cada uno de los pigmentos presentes en las muestras de cereales. Es habitual que dichas reacciones degradativas mediadas por factores como el oxígeno y la temperatura que acontecen según los distintos procesos de almacenamiento o procesamiento de los alimentos, trascurren ajustándose a cinéticas de orden cero o primer orden. La bibliografía cuenta con numerosos ejemplos al respecto (Philip y Francis, 1971; Wagner y Warthesen, 1995; Sharma y Le Moguer, 1996; Selim *et al.*, 2000; Fish y Davis, 2003; Zepka *et al.*, 2009; Ouchi *et al.*, 2010; Saxena *et al.*, 2012). Las **Tablas 28 y 29** muestran los ajustes y coeficientes de correlación obtenidos tanto para pigmentos libres como totales (incluyendo los esterificados) asumiendo un modelo cinético de orden cero. De manera análoga las **Tablas 30 y 31** muestran los parámetros cinéticos resultantes de aplicar un ajuste de primer orden. Como se deduce de los valores del coeficiente de correlación lineal (R^2) el modelo cinético al que mejor se ajustaron los datos resultó ser el de primer orden, lo que indica que la velocidad de reacción es directamente proporcional a



la concentración de pigmento (consultar **Tabla 8** de la sección *Materiales y Métodos*). Numerosos estudios realizados en alimentos con bajo contenido de humedad, como es el caso de los cereales o aquellos sometidos a procesos de deshidratación, describen que la velocidad de degradación de carotenoides durante el procesado de los alimentos se ajustan a cinéticas de primer orden (Walter y Purcell, 1974; Haralampu y Karen, 1983; Jarén-Galán y Mínguez-Mosquera, 1997; Tsimidou, 1997; Pérez-Gálvez *et al.*, 2000; Koca *et al.*, 2007; Lavelli, *et al.*, 2007; Hidalgo y Brandolini, 2008b).

Los datos indicados corresponden a su vez a los pigmentos y a las fracciones totales de los mismos que mostraban una evolución, conforme transcurría el almacenamiento, ajustada a una cinética degradativa creciente con la temperatura, lo que permite cuantificar finalmente dichos cambios. En este sentido, es importante indicar la diferencia en la evolución de las fracciones esterificadas, en las que la realización de un estudio cinético completo fue imposible debido a la constancia o retención de tales pigmentos a lo largo del almacenamiento. No obstante, los valores de constantes de velocidad (k), sobre todo a las temperaturas 37 y 50°C, y la contribución de tales fracciones esterificadas sobre las totales que las contienen, arrojaron datos útiles sobre la cinética de la reacción, así como de la importancia del medio que rodea al pigmento. Las condiciones medioambientales, el medio de reacción y la estructura del pigmento son factores que pueden modificar los parámetros cinéticos de una reacción (Jarén-Galán y Mínguez-Mosquera, 1997; Pérez-Gálvez *et al.*, 2000).

El estudio cinético, realizado con ambas especies de cereales, mostró un progresivo aumento de k conforme aumentó la temperatura en concordancia con Ley de Arrhenius. Esta asociación está en consonancia con trabajos previos como los de Koca *et al.* (2007) realizados con zanahorias deshidratadas; Saxena *et al.* (2012) realizados con jaca (frutos populares de la india); Bechoff *et al.* (2010) con patatas fritas; Dhuique-Mayer *et al.* (2007) llevados a cabo con zumos de cítricos; o los realizados con puré de papaya por Ahmed *et al.* (2002). El análisis de los pigmentos libres no indica diferencia alguna entre ambos tipos de cereales, aunque ambos muestran marcadas diferencias en el contenido de los mismos. Los valores de k fueron similares tanto para las fracciones libres totales, luteína libre, *cis*-luteína y carotenoides libres totales, como para los individuales, *all-trans*-luteína y β -caroteno (**Tabla 30**). Los datos cinéticos obtenidos evidencian también una similitud en el comportamiento de los pigmentos, destacando la ausencia de diferencias acusadas entre los carotenos (β -caroteno) y las xantofilas presentes. En otros estudios de estabilidad térmica de carotenoides, algunos autores indican distinciones relevantes entre la velocidad de degradación de ambos grupos de pigmentos (Cortés *et al.*, 2006; Dhuique-Mayer *et al.*, 2007). No obstante, para el caso de tritordeum, las fracciones de pigmentos totales que



contienen a su vez las fracciones esterificadas de luteína (es decir, luteína total y carotenoides totales; **Tabla 31**), reflejaron un claro descenso en los valores de k para todas las temperaturas, lo que indica que la reacción se retrasa debido a la presencia y/o contribución de los pigmentos esterificados. Este descenso fue aún más acusado para las temperaturas de 37 y 50°C. Con respecto a trigo duro, este efecto no es posible poder observarlo a nivel de las fracciones totales ya que la contribución de las formas esterificadas resulta ser muy minoritaria, aunque el análisis más en detalle de éstas si permite obtener datos relevantes.

En la **Tabla 32** se proporcionan los respectivos valores de k , tanto para trigo duro como tritordeum, en relación a las fracciones esterificadas y sus correspondientes regioisómeros en los casos en los que se obtuvieron buenos ajustes. Las velocidades de reacción resultaron ser siempre menores que las que mostró luteína libre total, al menos para las temperaturas de 37 y 50°C. En trigo duro, las constantes de velocidad para la fracción de monoésteres totales a 37 y 50°C resultó ser respectivamente del orden de cinco y cuatro veces más bajas cuando se comparan con las obtenidas para la fracción de luteína libre total a esas mismas temperaturas. A nivel de regioisómeros solo se pudieron calcular los valores de k para el monoéster con ácido palmítico, no existiendo disimilitudes entre ambos con respecto a la velocidad de reacción. Los valores de k para luteína monopalmitato a las temperaturas de 37 y 50°C, similar al de sus regioisómeros, son más altos que la fracción monoesterificada total lo que indica el aporte en ésta última del monoéster con ácido linoleico y sus correspondientes regioisómeros. Para esto últimos y a 50°C, sólo fue posible calcular el valor de k para luteína-3'-*O*-linoleato, siendo éste considerablemente más reducido que el obtenido para su homólogo con ácido palmítico, lo cual es consistente con los resultados comentados anteriormente.

El análisis cinético en tritordeum resultó bastante más completo debido al mayor contenido en ésteres al facilitar más información con respecto al monoéster con ácido linoleico, confirmando a nivel cinético su mayor estabilidad. Los valores de k para sus correspondientes regioisómeros a la temperatura de 50°C indicaron, como se comentó anteriormente, una diferencia en la velocidad de reacción dependiendo de la posición del ácido graso en la molécula. La velocidad de la reacción fue superior para la forma esterificada en la posición 3 que para la correspondiente en 3', siendo por tanto esta última más estable a dicha temperatura aunque, según los datos mostrados en esta tesis doctoral, la posición 3 es la que muestra mayor preferencia por las enzimas XAT involucradas en la reacción de esterificación. Sin embargo, los regioisómeros de luteína esterificada con ácido palmítico presentaron valores de k similares. Con respecto a la fracción de los diésteres totales, éstos mostraron en general valores de k inferiores a los monoésteres. Los datos



obtenidos apuntan al diéster dipalmitato como el menos estable al presentar a 50°C un valor de k mayor con respecto a los otros dos diésteres que presentan en su estructura linoleico, confiriéndoles una mayor estabilidad. Para las fracciones totales de ambos grupos, monoéster y diéster, los valores de k a la temperatura 50°C fueron del orden de 2 y 5 veces inferior, respectivamente, con respecto a los de la fracción de luteína libre. Los datos expuestos en relación a las constantes de velocidad (k) permiten de nuevo establecer una mayor estabilidad de las formas diesterificadas frente a las monoesterificadas, y éstas a su vez frente a los pigmentos en estado libre. Los estudios cinéticos con respecto a la degradación de ésteres de carotenoides no han recibido mucha atención hasta la fecha. Los escasos trabajos que se encuentran en la bibliografía son centrados en el estudio de la cinética de la reacción de hidrólisis de los ésteres de xantofilas durante el proceso de saponificación, al ser ésta una etapa rutinaria dentro del proceso de análisis de pigmentos carotenoides (Mínguez-Mosquera y Pérez-Gálvez, 1998; Yuan y Chen, 1999).

Los valores de vida media ($t_{1/2}$) y de D (Tablas 30 y 31) resultan de interés y complementan el anterior análisis de las constantes de velocidad, indicando el tiempo de vida útil del alimento, en este caso de granos de cereales, con respecto al contenido en pigmentos carotenoides, al tiempo que proporciona una herramienta rápida para estimar en términos cronológicos la concentración de pigmentos que encontraremos en un cereal almacenado bajo condiciones de temperatura controladas. En el modelo cinético de primer orden existe una relación inversa entre el valor $t_{1/2}$ (también para D) y el valor de k por lo que el efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción se traduce en descensos en $t_{1/2}$ y D . La comparación de los valores de $t_{1/2}$ y de D para los pigmentos libres en ambos cereales mostró claras similitudes debido a la que los valores de k para dichos pigmentos fueron parecidos en ambos casos. Por el contrario, el contenido de carotenoides totales presentó valores superiores de $t_{1/2}$ y D a las temperaturas 37 y 50°C en tritordeum (2 y 3 veces con respecto a trigo duro, respectivamente). Estos resultados suponen unos beneficios directos desde el punto de vista nutricional lo que convierte a tritordeum no solo en un cereal de partida con un mayor contenido en carotenoides, sino también con una mayor capacidad en la retención de los mismos cuando dichos granos son almacenados.

Las diferencias descritas en el presente estudio cinético, entre ambas especies de cereales, no deben ser atribuidas a la mayor concentración de pigmentos que presenta tritordeum sino, como claramente lo demuestra la comparación en cada caso entre las fracciones libres y totales, a la proporción de éstos que se encuentra esterificada. Los resultados obtenidos están en consonancia con procesos degradativos en los que el comportamiento y estabilidad de carotenoides está influenciada por factores como la temperatura y el oxígeno, y modulada por la estructura química de éstos. El proceso de

esterificación de xantofilas, luteína en nuestro caso, resulta ser altamente específico y con diferencias relevantes, en cuanto a estabilidad para los carotenoides en función del ácido graso que esté implicado en la reacción y en la posición en la molécula de luteína que éste ocupa.

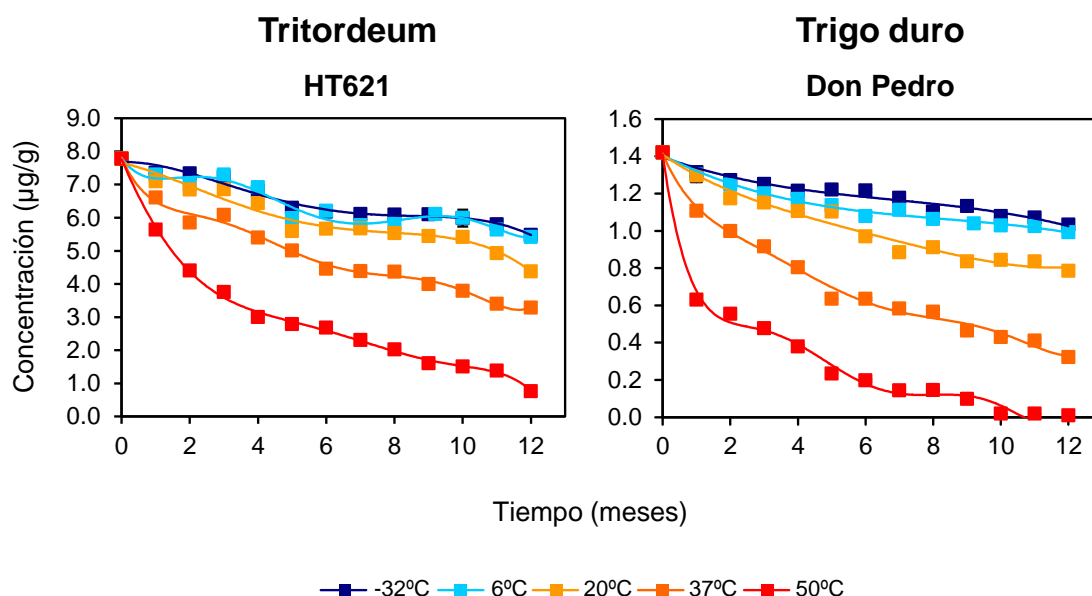


Figura 152. Evolución del contenido carotenoide total ($\mu\text{g/g}$) presente en granos de tritordeum (HT621) y trigo duro (Don Pedro) durante el almacenamiento prolongado (12 meses) a -32 , 6 , 20 , 37 y 50°C . Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de tres análisis ($n=3$).

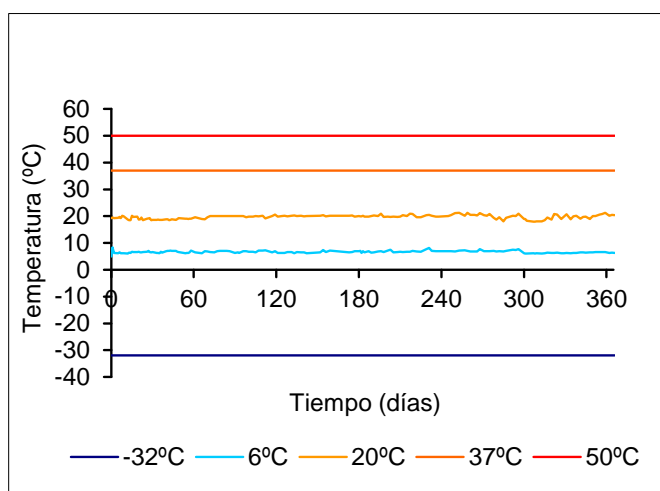
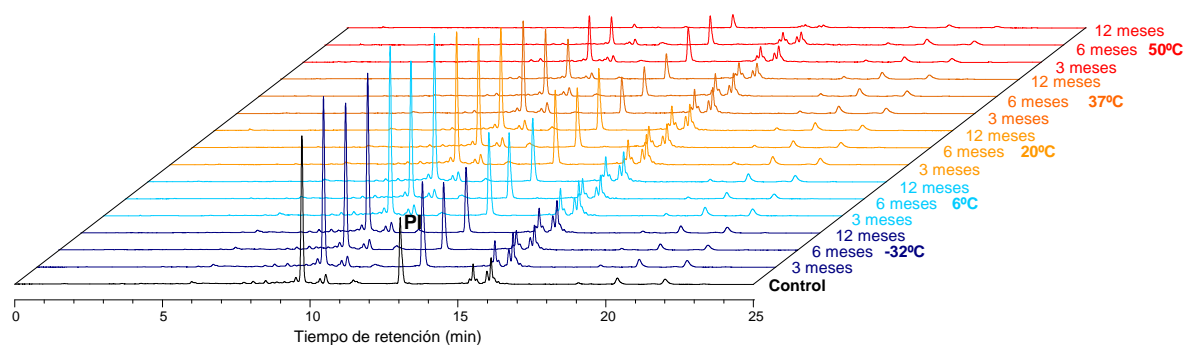


Figura 153. Registro de temperaturas (-32 , 6 , 20 , 37 y 50°C) impuestas durante el almacenamiento prolongado (12 meses) de granos de tritordeum (HT621) y trigo duro (Don Pedro).

Tritordeum (HT621)



Trigo duro (Don Pedro)

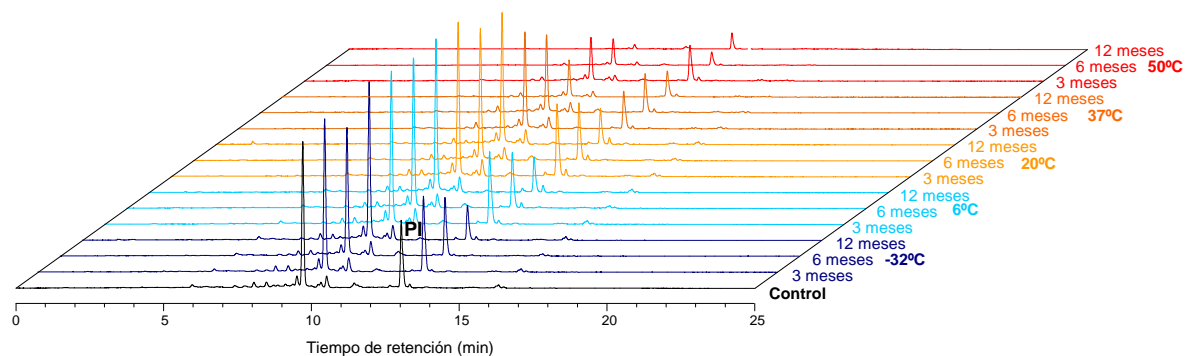


Figura 154. Evolución del perfil cromatográfico de pigmentos carotenoides presentes en granos de tritordeum (HT621) y trigo duro (Don Pedro) durante el almacenamiento prolongado (12 meses) a -32, 6, 20, 37 y 50°C. PI: patrón interno.

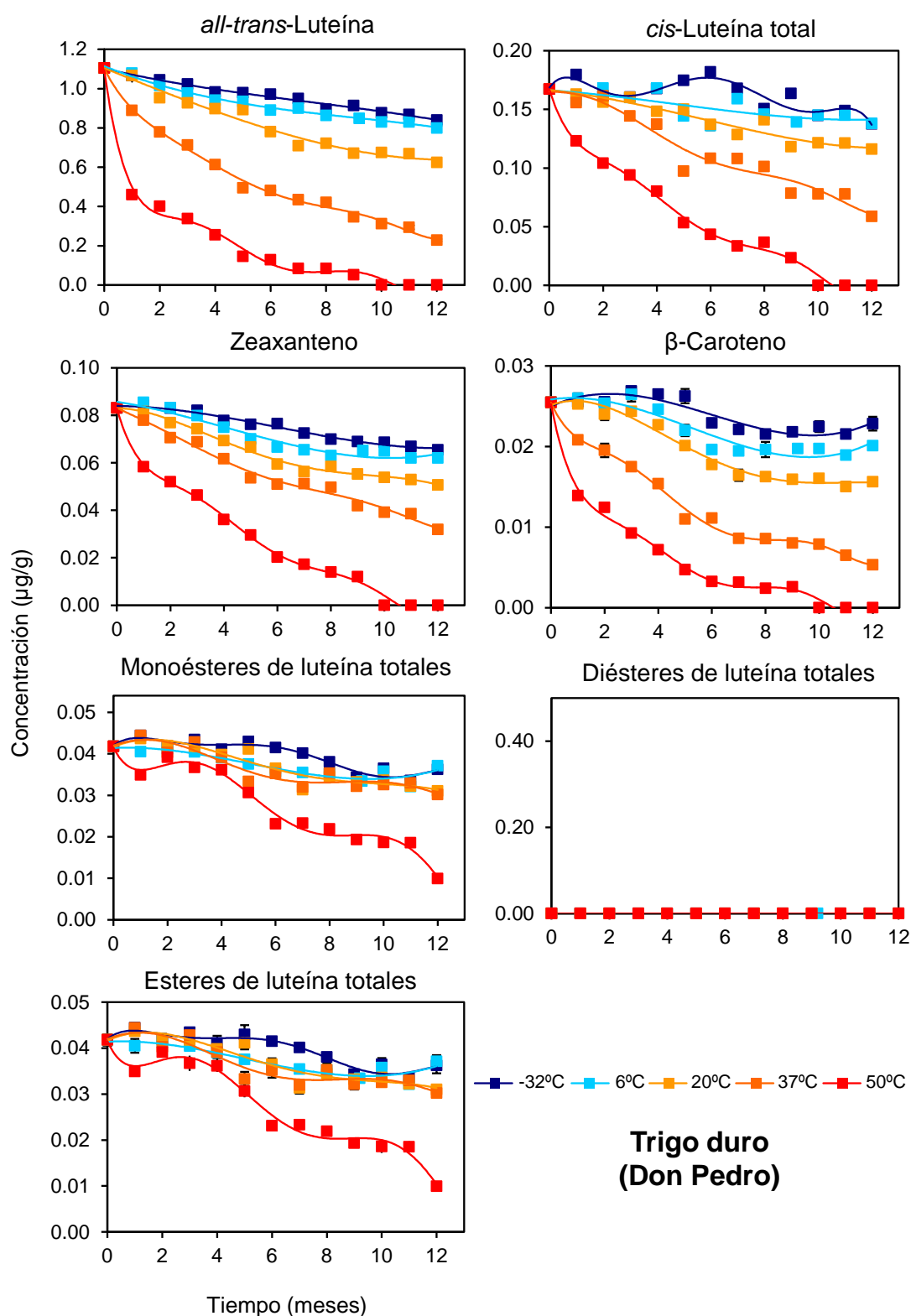


Figura 155. Evolución del contenido (µg/g) en carotenoides individuales (*all-trans*-luteína, *cis*-luteína zeaxanteno y β-caroteno) y fracciones esterificadas de luteína (monoésteres, diésteres y ésteres totales) presentes en granos de trigo duro (Don Pedro) durante el almacenamiento prolongado (12 meses) a -32, 6, 20, 37 y 50°C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de tres análisis (n=3).

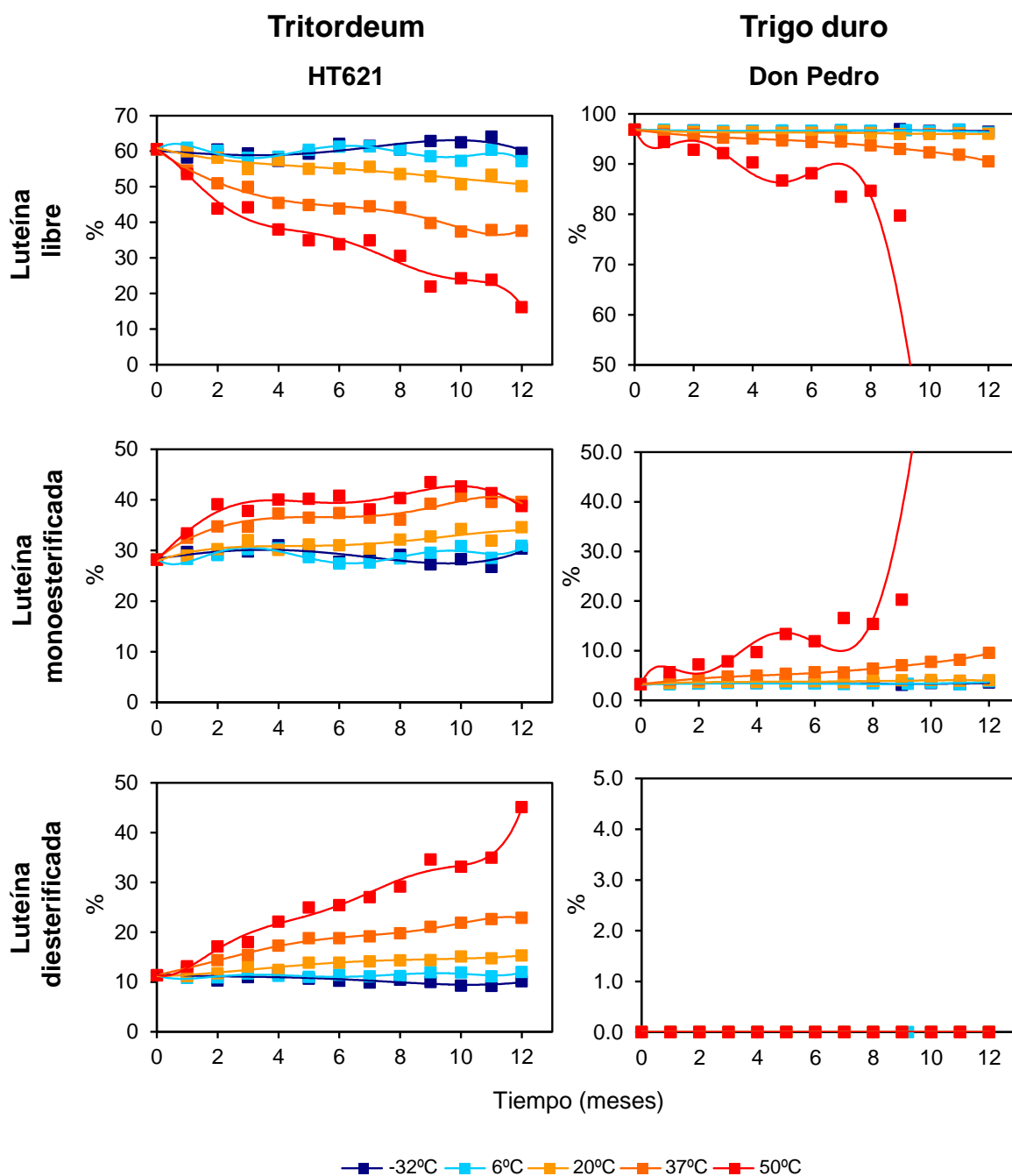
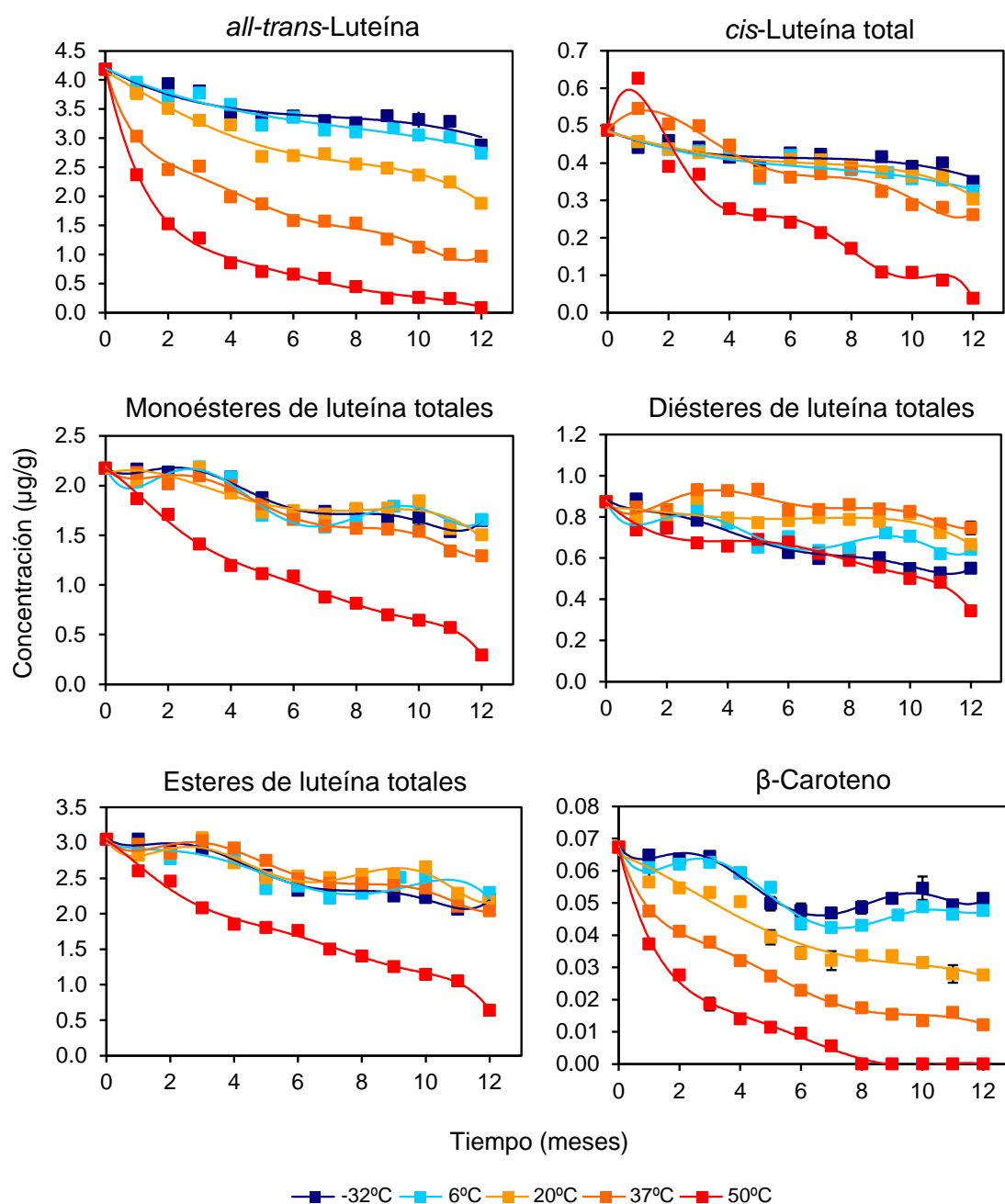


Figura 156. Efecto de la temperatura (-32, 6, 20, 37 y 50°C) sobre el grado de esterificación de luteína durante el almacenamiento prolongado (12 meses) de granos de tritordeum (HT621) y trigo duro (Don Pedro). Para cada especie los datos expresan la contribución porcentual de cada fracción (libre, monoesterificada y diesterificada).



Tritordeum (HT621)

Figura 157. Evolución del contenido (μg/g) en carotenoides individuales (*all-trans*-luteína, *cis*-luteína y β-caroteno) y fracciones esterificadas de luteína (monoésteres, diésteres y ésteres totales) presentes en granos de tritordeum (HT621) durante el almacenamiento prolongado (12 meses) a -32, 6, 20, 37 y 50°C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de tres análisis (n=3).

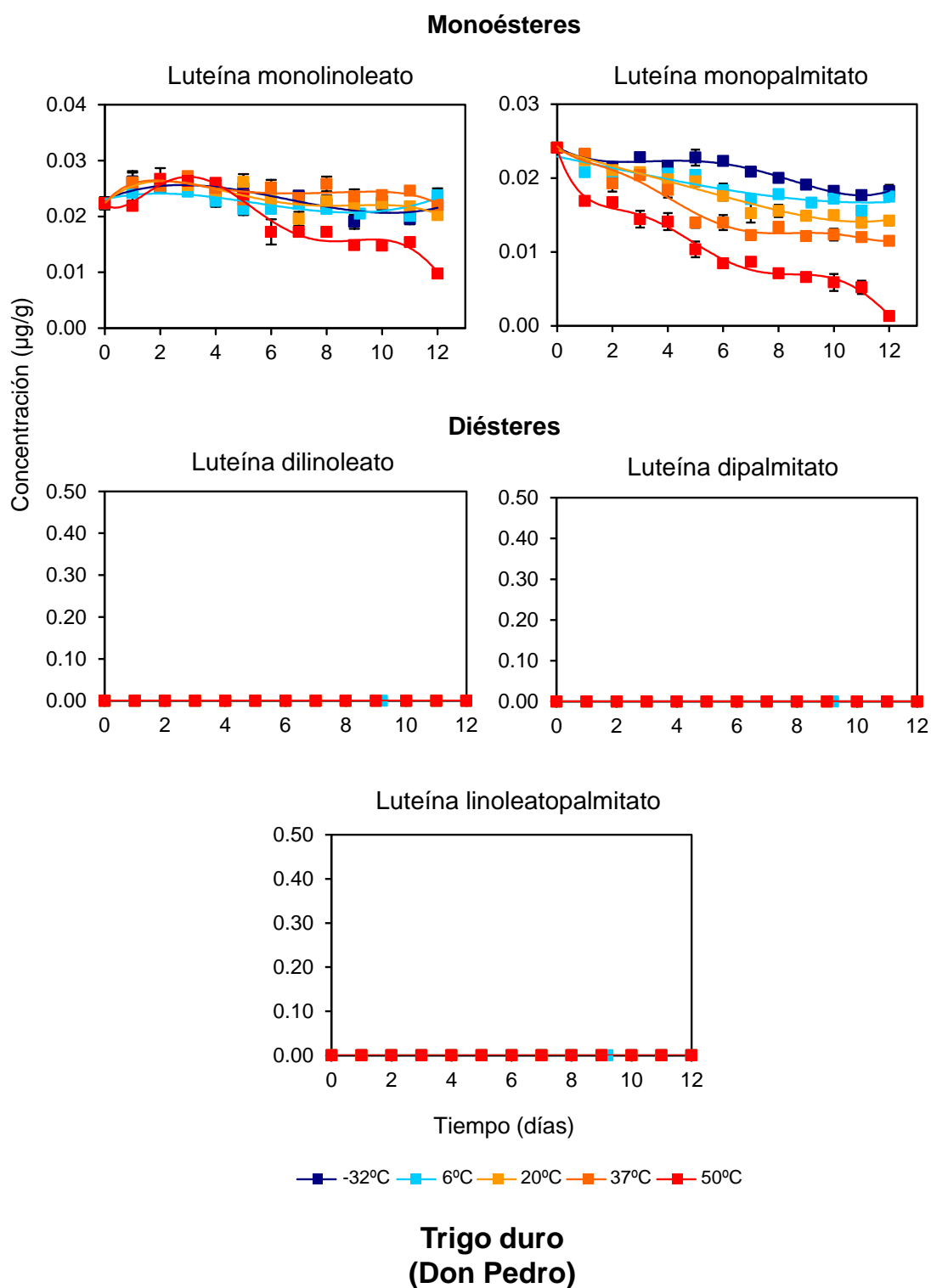


Figura 158. Evolución individual del contenido ($\mu\text{g/g}$) en monoésteres y diésteres de luteína presentes presentes en granos de trigo duro (Don Pedro) durante el almacenamiento prolongado (12 meses) a -32 , 6 , 20 , 37 y 50°C . Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de tres análisis ($n=3$).

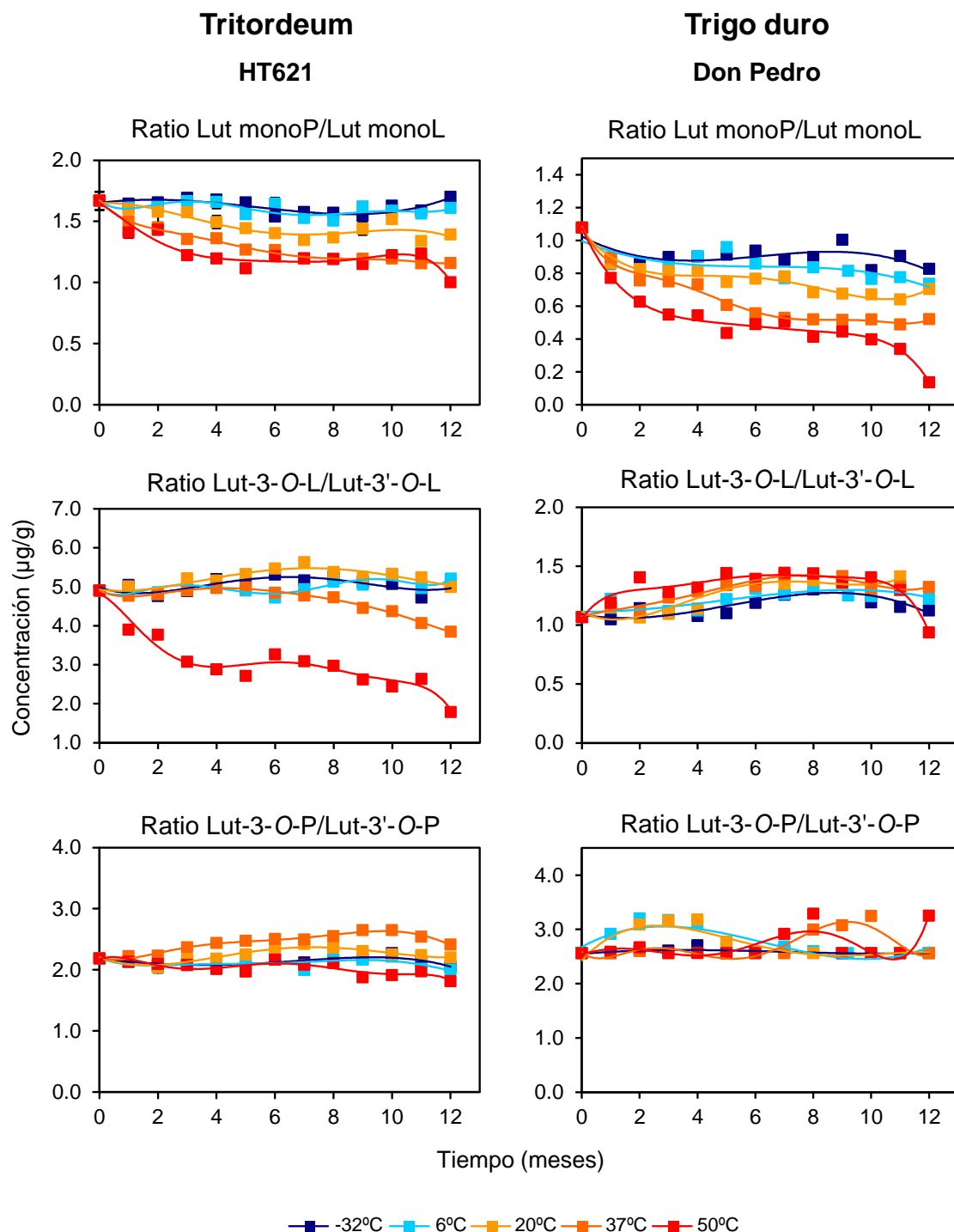


Figura 159. Cambios en los ratios de las fracciones de luteína monesterificada y los correspondientes regioisómeros presentes en granos de tritordeum (HT621) y trigo duro (Don Pedro) durante el almacenamiento prolongado (12 meses) a -32, 6, 20, 37 y 50°C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de tres análisis (n=3). Lut monoP (Luteína monopalmitato), Lut monoL (Luteína monolinoleato), Lut-3-O-L (Luteína-3-O-linoleato), Lut-3'-O-L (Luteína-3'-O-linoleato), Lut-3-O-P (Luteína-3-O-palmitato), Lut-3'-O-P (Luteína-3'-O-palmitato).

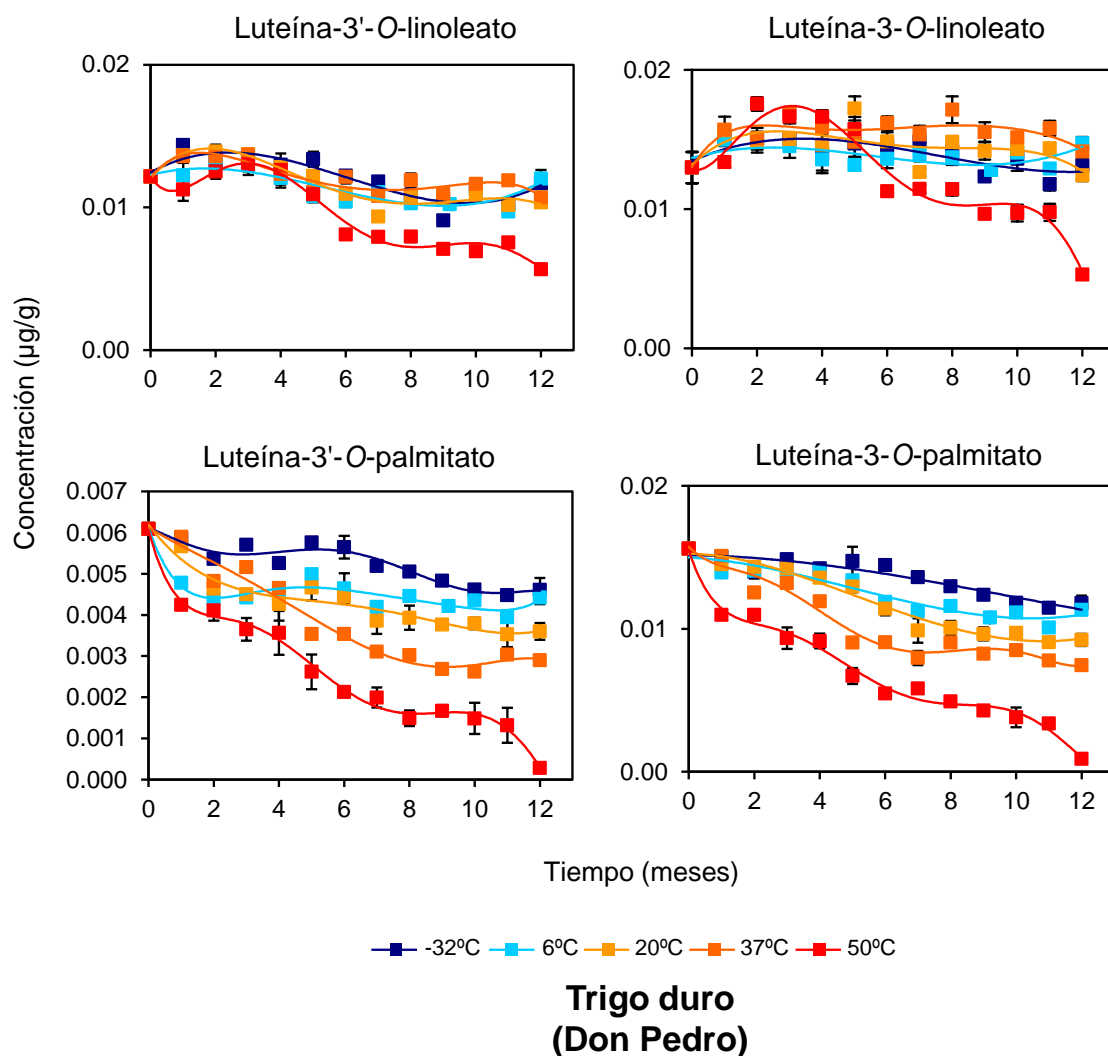
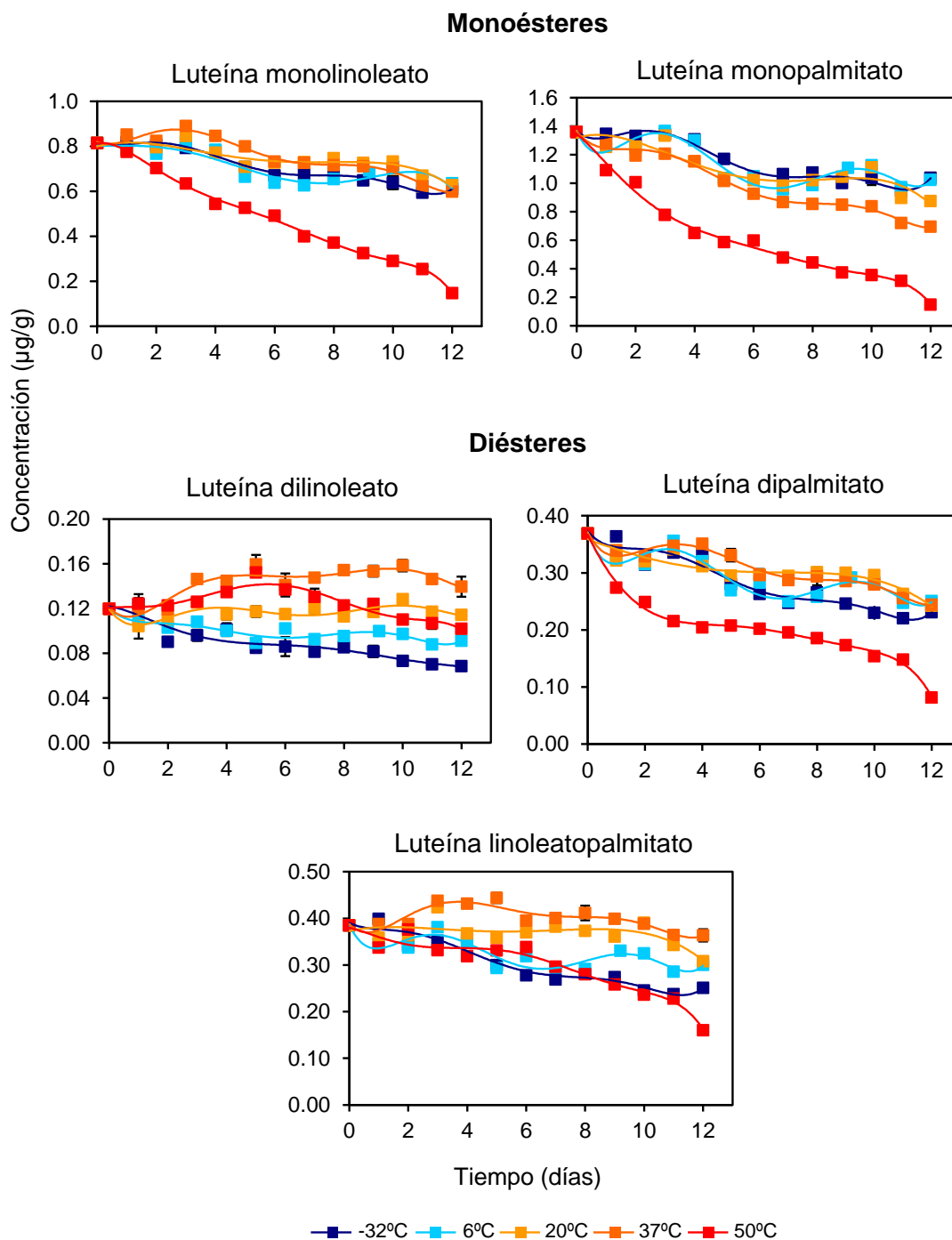


Figura 160. Cambios en el contenido de regiosómeros de luteína monolinoleato y luteína monopalmitato presentes en granos de trigo duro (Don Pedro) durante el almacenamiento prolongado (12 meses) a -32, 6, 20, 37 y 50°C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de tres análisis (n=3).



Tritordeum (HT621)

Figura 161. Evolución individual del contenido ($\mu\text{g/g}$) en monoésteres y diésteres de luteína presentes presentes en granos de tritordeum (HT621) durante el almacenamiento prolongado (12 meses) a -32, 6, 20, 37 y 50°C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de tres análisis ($n=3$).

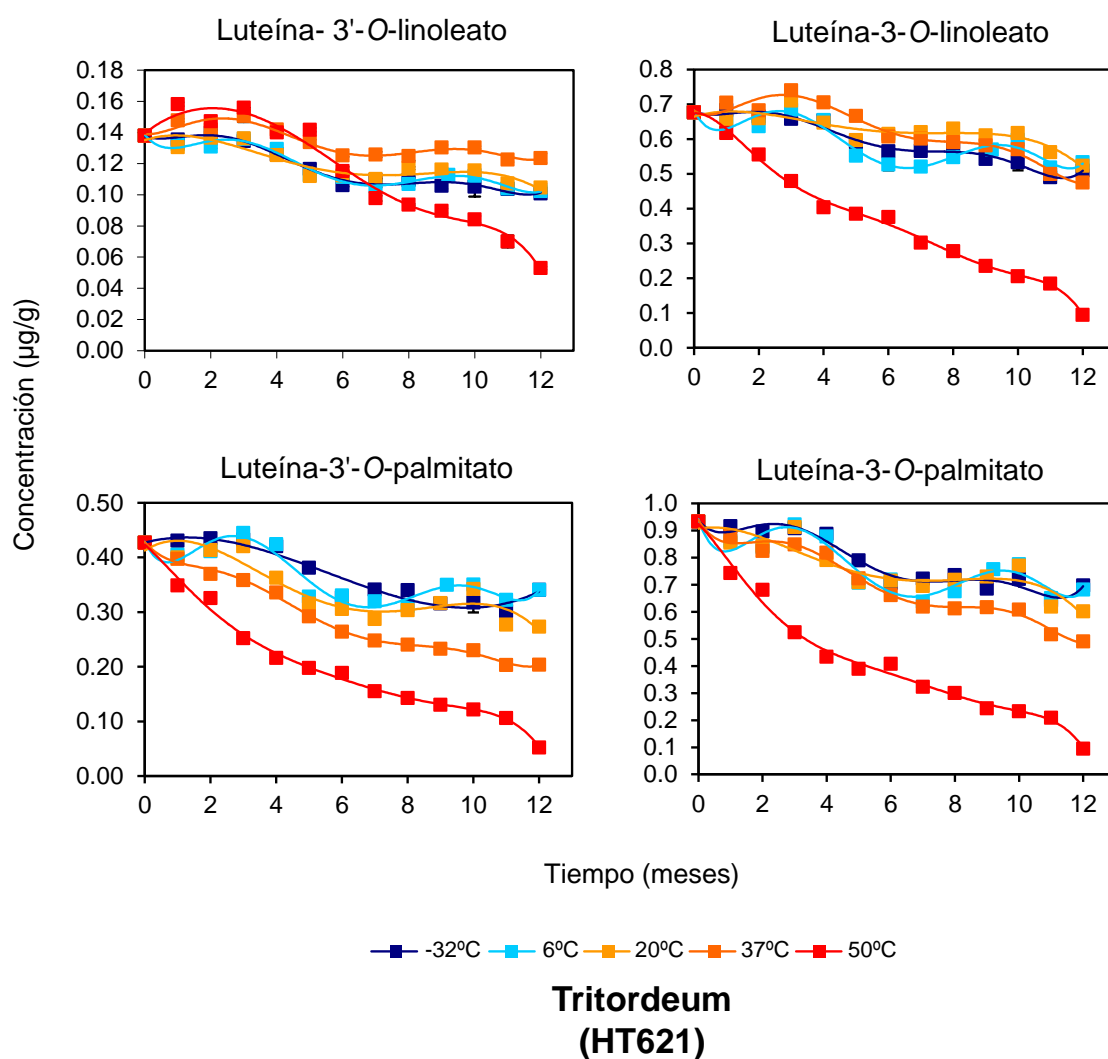


Figura 162. Cambios en el contenido de regiosómeros de luteína monolinoleato y luteína monopalmitato presentes en granos de tritordeum (HT621) durante el almacenamiento prolongado (12 meses) a -32 , 6 , 20 , 37 y 50°C . Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de tres análisis ($n=3$).



Tabla 25. Composición cualitativa y cuantitativa ($\mu\text{g/g}$)* de pigmentos carotenoides presentes en granos de tritordeum y trigo duro sometidas a almacenamiento prolongado en condiciones de temperatura controlada.

Pigmento	Tritordeum (HT621)	Trigo (Don Pedro)
all- <i>trans</i> -Zeaxanteno	-	0.08 \pm 0.00
all- <i>trans</i> -Luteína	4.18 \pm 0.09	1.11 \pm 0.01
9- <i>cis</i> -Luteína	0.19 \pm 0.00	0.06 \pm 0.00
13- <i>cis</i> -Luteína	0.30 \pm 0.01	0.11 \pm 0.00
Luteína monolinoleato	0.81 \pm 0.00	0.02 \pm 0.00
Luteína-3'- <i>O</i> -linoleato	0.14 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00
Luteína-3- <i>O</i> -linoleato	0.68 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00
Luteína monopalmitato	1.36 \pm 0.01	0.02 \pm 0.00
Luteína-3'- <i>O</i> -palmitato	0.43 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00
Luteína-3- <i>O</i> -palmitato	0.93 \pm 0.01	0.02 \pm 0.00
Luteína dilinoleato	0.12 \pm 0.00	-
Luteína linoleatopalmitato	0.39 \pm 0.01	-
Luteína dipalmitato	0.37 \pm 0.00	-
all- <i>trans</i> - β -Caroteno	0.07 \pm 0.00	0.02 \pm 0.00
Luteína total	7.72 \pm 0.07	1.31 \pm 0.01
Monoésteres totales	2.17 \pm 0.01	0.04 \pm 0.00
Diésteres totales	0.87 \pm 0.01	-
Esteres totales	3.05 \pm 0.01	0.04 \pm 0.00
Carotenoides totales	7.79 \pm 0.07	1.42 \pm 0.02

*La tabla representa los valores medios y error estándar de la media para cuatro replicados (n=4).



Tabla 26. Composición relativa (%)* de las formas libres y esterificadas de luteína en granos de tritordeum y trigo duro al inicio del almacenamiento prolongado (12 meses).

Cereal	Luteína libre	Luteína monoesterificada	Luteína diesterificada	Esteres totales
Tritordeum	60.51 ± 1.24	28.16 ± 0.14	11.32 ± 0.17	39.48 ± 0.31
Trigo duro	96.80 ± 1.08	3.19 ± 0.01	-	3.19 ± 0.09

*La tabla representa los valores medios y error estándar de la media para cuatro replicados (n=4).

Tabla 27. Composición relativa (%)* de las fracciones monoesterificadas de luteína y sus correspondientes regioisómeros indicando el ratio de los mismos, así como la de diésteres, en granos de tritordeum y trigo duro al inicio del almacenamiento durante doce meses.

Pigmento	Tritordeum (HT 621)	Trigo duro (Don Pedro)
Luteína monolinoleato	37.44 ± 0.15	47.60 ± 1.72
Luteína-3'- <i>O</i> -linoleato	6.35 ± 0.03	23.80 ± 0.48
Luteína-3- <i>O</i> -linoleato	31.09 ± 0.21	23.80 ± 2.38
Ratio Lut-3- <i>O</i> -L/Lut-3'- <i>O</i> -L	5	1
Luteína monopalmitato	62.56 ± 0.21	52.37 ± 0.84
Luteína-3'- <i>O</i> -palmitato	19.64 ± 0.09	14.28 ± 0.00
Luteína-3- <i>O</i> -palmitato	42.92 ± 0.28	38.09 ± 1.20
Ratio Lut-3- <i>O</i> -P/Lut-3'- <i>O</i> -P	2	3
Luteína dilinoleato	13.73 ± 0.52	-
Luteína linoleatopalmitato	44.05 ± 0.63	-
Luteína dipalmitato	42.22 ± 0.35	-

* La tabla representa los valores medios y el error estándar de la media para cuatro replicados (n=4).

Tabla 28. Ajuste de un modelo cinético de orden cero ($C-C_0=-kt$) a la evolución del contenido pigmentos libres (no esterificados) presentes en granos de tritordeum y trigo duro sometidos a almacenamiento prolongado en condiciones de temperatura controlada.

Pigmento	Tª (°C)	Tritordeum		Trigo duro	
		k (mes ⁻¹)	R ²	k (mes ⁻¹)	R ²
all- <i>trans</i> -Zeaxanteno	-32	-	-	0.0015	0.9384
	6	-	-	0.0020	0.8784
	20	-	-	0.0030	0.9381
	37	-	-	0.0045	0.9541
	50	-	-	0.0084	0.8046
all- <i>trans</i> -Luteína	-32	0.1063	0.6686	0.0229	0.9725
	6	0.1243	0.8593	0.0284	0.8999
	20	0.2006	0.8686	0.0451	0.9204
	37	0.3316	0.5338	0.0849	0.7831
	50	0.4461	0.0285	0.1226	0.0720
all- <i>trans</i> -β-Caroteno	-32	0.0019	0.5573	0.0003	0.5613
	6	0.0023	0.6328	0.0005	0.7598
	20	0.0040	0.8112	0.0009	0.9023
	37	0.0057	0.5739	0.0018	0.8277
	50	0.0075	0.1871	0.0025	0.3285
<i>cis</i> -Luteína libre total	-32	0.0105	0.5795	0.0013	0.3352
	6	0.0137	0.7837	0.0025	0.5796
	20	0.0131	0.7981	0.0044	0.9176
	37	0.0176	0.8339	0.0090	0.9324
	50	0.0389	0.8914	0.0167	0.8233
Luteína libre total	-32	0.1168	0.6659	0.0242	0.9603
	6	0.1380	0.8560	0.0309	0.9051
	20	0.2137	0.8694	0.0496	0.9287
	37	0.3492	0.6346	0.0939	0.8246
	50	0.4850	0.2376	0.1393	0.0954
Carotenoides libres totales	-32	0.1186	0.6679	0.0345	0.8040
	6	0.1403	0.8563	0.0414	0.7042
	20	0.2177	0.8694	0.0605	0.8439
	37	0.3556	0.6338	0.1056	0.7357
	50	0.4926	0.2369	0.1517	0.0040



Tabla 29. Ajuste a un modelo cinético de orden cero ($C-C_0=-kt$) a la evolución del contenido de pigmentos totales (incluyendo xantofilas esterificadas) presentes en granos de tritordeum y trigo duro sometidos a almacenamiento prolongado en condiciones de temperatura controlada.

Pigmento	Tª (°C)	Tritordeum		Trigo duro	
		k (mes ⁻¹)	R ²	k (mes ⁻¹)	R ²
Luteína total	-32	0.024	0.8901	0.025	0.9643
	6	0.031	0.7893	0.032	0.9072
	20	0.050	0.8674	0.051	0.9308
	37	0.094	0.8119	0.095	0.8294
	50	0.140	0.5378	0.142	0.1359
Carotenoides totales	-32	0.203	0.8881	0.035	0.8262
	6	0.215	0.7892	0.042	0.7130
	20	0.283	0.8674	0.061	0.8519
	37	0.432	0.8098	0.107	0.7430
	50	0.698	0.5348	0.154	0.0376

Tabla 30. Ajuste de un modelo cinético de primer orden ($\ln(C/C_0) = -kt$) a la evolución del contenido pigmentos libres (no esterificados) presentes en granos de tritordeum y trigo duro sometidos a almacenamiento prolongado en condiciones de temperatura controlada.

Pigmento	Tª (°C)	Tritordeum				Trigo duro			
		k (mes ⁻¹)	R ²	t _{1/2} (meses)	D (meses)	k (mes ⁻¹)	R ²	t _{1/2} (meses)	D (meses)
<i>all-trans</i> - Zeaxanteno	-32	-	-	-	-	0.019	0.9357	36	121
	6	-	-	-	-	0.028	0.8876	25	83
	20	-	-	-	-	0.044	0.9572	16	52
	37	-	-	-	-	0.075	0.9783	9	31
	50	-	-	-	-	0.220	0.9887	3	10
<i>all-trans</i> - Luteína	-32	0.029	0.7109	24	80	0.023	0.9729	30	100
	6	0.035	0.8943	20	67	0.029	0.9345	24	79
	20	0.063	0.9345	11	37	0.051	0.9524	14	45
	37	0.135	0.9893	5	17	0.130	0.9740	5	18
	50	0.301	0.9292	2	8	0.356	0.9322	2	6
<i>all-trans</i> -β- Caroteno	-32	0.032	0.5413	22	72	0.013	0.5705	54	180
	6	0.040	0.6190	17	57	0.027	0.7619	26	87
	20	0.083	0.9043	8	28	0.048	0.9077	14	48
	37	0.157	0.9206	4	15	0.131	0.9662	5	18
	50	0.361	0.9585	2	6	0.298	0.9329	2	8
<i>cis</i> -Luteína libre total	-32	0.024	0.6143	29	96	0.005	0.3544	43	274
	6	0.033	0.8107	21	71	0.016	0.5769	43	142
	20	0.031	0.7961	22	74	0.031	0.9108	23	75
	37	0.045	0.8413	15	51	0.076	0.9196	9	30
	50	0.158	0.8828	4	15	0.213	0.9755	3	11
Luteína libre total	-32	0.028	0.7081	25	81	0.021	0.9597	33	1010
	6	0.034	0.8907	20	67	0.027	0.9341	25	84
	20	0.059	0.9286	12	39	0.048	0.9550	14	48
	37	0.122	0.9179	6	19	0.121	0.9752	6	19
	50	0.275	0.9417	2	8	0.328	0.9374	2	7
Carotenoides libres totales	-32	0.028	0.7099	24	81	0.028	0.8613	24	81
	6	0.034	0.8914	20	67	0.035	0.7921	20	66
	20	0.059	0.9295	12	39	0.056	0.9185	12	41
	37	0.122	0.9183	6	19	0.129	0.9596	5	18
	50	0.276	0.9429	3	8	0.337	0.9247	2	7



Tabla 31. Ajuste de un modelo cinético de primer orden ($\ln(C/C_0)=-kt$) a la evolución del contenido de pigmentos totales (incluyendo xantofilas esterificadas) presentes en granos de tritordeum y trigo duro sometidos a almacenamiento prolongado en condiciones de temperatura controlada.

Pigmento	Tª (°C)	Tritordeum				Trigo duro			
		k (mes ⁻¹)	R ²	t _{1/2} (meses)	D (meses)	k (mes ⁻¹)	R ²	t _{1/2} (meses)	D (meses)
Luteína total	-32	0.030	0.9149	23	78	0.021	0.9623	33	111
	6	0.032	0.8160	22	73	0.027	0.9356	26	85
	20	0.044	0.9228	16	52	0.047	0.9547	15	49
	37	0.076	0.9389	9	30	0.116	0.9735	6	20
	50	0.177	0.9368	4	13	0.361	0.9254	2	6
Carotenoides totales	-32	0.030	0.9130	23	78	0.028	0.8778	25	83
	6	0.032	0.8160	22	72	0.034	0.7978	20	67
	20	0.044	0.9035	16	52	0.055	0.9212	13	42
	37	0.077	0.9386	9	30	0.124	0.9571	6	19
	50	0.178	0.9372	4	13	0.371	0.9257	2	6



Tabla 32. Constantes de velocidad y coeficientes de correlación para un modelo cinético de primer orden en pigmentos esterificados en granos de tritordeum y trigo duro sometidos a almacenamiento prolongado.

Pigmento	Tª (°C)	Tritordeum		Trigo duro	
		k (mes ⁻¹)	R ²	k (mes ⁻¹)	R ²
Luteína monolinoleato	20	-	-	-	-
	37	-	-	-	-
	50	0.109	0.9220	-	-
Luteína-3'- <i>O</i> -linoleato	20	-	-	-	-
	37	-	-	-	-
	50	0.052	0.7034	0.052	0.7889
Luteína-3- <i>O</i> -linoleato	20	-	-	-	-
	37	-	-	-	-
	50	0.126	0.9224	-	-
Luteína monopalmitato	20	0.035	0.7531	0.050	0.9452
	37	0.056	0.9662	0.072	0.8691
	50	0.152	0.9311	0.169	0.8306
Luteína-3'- <i>O</i> -palmitato	20	0.038	0.7427	0.053	0.7226
	37	0.067	0.9709	0.078	0.8644
	50	0.144	0.9348	0.175	0.8095
Luteína-3- <i>O</i> -palmitato	20	0.034	0.7399	0.049	0.9357
	37	0.051	0.9528	0.070	0.8527
	50	0.156	0.9283	0.166	0.8363
Monoésteres totales	20	0.028	0.7653	0.024	0.7918
	37	0.040	0.9383	0.026	0.7908
	50	0.134	0.9400	0.088	0.8619
Luteína dilinoleato	20	-	-	-	-
	37	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
Luteína linoleatopalmitato	20	-	-	-	-
	37	-	-	-	-
	50	-	-	-	-
Luteína dipalmitato	20	-	-	-	-
	37	0.031	0.8926	-	-
	50	0.100	0.7617	-	-
Diésteres totales	20	-	-	-	-
	37	-	-	-	-
	50	0.059	0.8396	-	-
Esteres totales	20	0.024	0.7250	0.024	0.7918
	37	0.029	0.8979	0.026	0.7908
	50	0.106	0.9387	0.088	0.8619

5.9.3. Evolución del contenido y composición de pigmentos carotenoides durante el almacenamiento prolongado de harinas integrales de trigo duro y tritordeum.

Los estudios de estabilidad realizados en la presente Tesis Doctoral no estarían completos sin analizar el efecto del almacenamiento prolongado sobre los carotenoides presentes en harinas integrales. Los cereales son sometidos a distintos procesos industriales para producir toda la gama de productos que se derivan de ellos. Entre dichos procesos podemos citar la fermentación, extrusión, procesos de horneado y tostado, etc., aunque el más conocido lo constituye la molienda, siendo por excelencia la harina el producto derivado y con más usos (McKevith, 2004). La **Tabla 33** indica la composición carotenóide de inicio de las muestras de harinas integrales empleadas en estas experiencias.

La evolución de carotenoides totales para ambas especies de cereales (**Figura 163**; **Tabla A30** del *Anexo*) reveló pérdidas acusadas a las temperaturas más extremas (37 y 50°C) produciéndose el agotamiento de los pigmentos a esta última temperatura al final del periodo de almacenamiento. Este dato es invariable en la experiencia realizada, siendo independiente del pigmento, libre o esterificado, y de la especie de cereal, lo que indica que las condiciones a este nivel son bastante intensas en cuanto a degradación se refiere. La **Figura 164** muestra la progresión cromatográfica obtenida para las harinas en este almacenamiento. Como fue introducido con anterioridad en las experiencias de almacenamiento corto, las condiciones experimentales que han sido ensayadas garantizan la intervención de actividades enzimáticas degradativas que desencadenan la co-oxidación de pigmentos carotenoides. Una de las enzimas más ampliamente caracterizadas, presente tanto en el reino vegetal como animal, son las lipoxigenasas. Las lipoxigenasas (EC 1.13.11.12, linoleato: oxígeno oxidoreductasa) son junto con las polifenol oxidasas (EC 1.14.18.1 o EC 1.10.3.2) y peroxidasas (EC 1.11.1.7) las enzimas mayoritariamente responsables de la generación de radicales libres en los tejidos vegetales. Los radicales libres están directamente implicados en la formación de compuestos volátiles indeseables y oxidación de otras moléculas presentes en los alimentos como vitaminas, pigmentos, lípidos, fenoles y proteínas. Estas reacciones afectan a la textura, el flavor y el color de los alimentos, especialmente durante el procesado y almacenamiento de los mismos (Whitaker, 1991; Robinson *et al.*, 1995). En cereales, sobre todo en trigos, las lipoxigenasas han sido muy estudiadas apuntando como sustrato preferencial al ácido linoleico y siendo ubicadas principalmente en el germen y el salvado (Miller y Kummerow, 1948; Wallace y Wheeler, 1975; Troccoli *et al.*, 2000; Rani *et al.*, 2001). Las harinas integrales empleadas en el presente estudio junto con la presencia de ácido linoleico justifica perfectamente la intervención de dicha enzima. Esta, unida a la propia susceptibilidad de los carotenoides, al



oxígeno y las temperaturas elevadas deben ser en conjunto responsables de la disminución en los niveles de carotenoides observados en el presente experimento. Las pérdidas porcentuales una vez transcurridos los doce meses de almacenamiento, para todas las temperaturas ensayadas, fueron similares para ambos cereales. El dato diferenciador a resaltar fueron los valores obtenidos a 37°C, siendo en trigo duro las pérdidas del 84% mientras que para tritordeum fueron del 72%, lo que se tradujo en una mayor retención de pigmentos en tritordeum a dicha temperatura.

La evolución de los pigmentos libres individuales para trigo duro (**Figura 165; Tabla A31 del Anexo**), reprodujo perfectamente el comportamiento anteriormente mostrado en la **Figura 163**. Las pérdidas observadas tras el almacenamiento, mostró a 20°C unos descensos considerables siendo para all-*trans*-luteína del 51% y para all-*trans*-zeaxanteno del 63%. Las mermas a 37°C fueron similares a las totales registradas a 50°C, en torno al 100%, para el caso de all-*trans*-luteína, all-*trans*-zeaxanteno y all-*trans*-β-caroteno. Los descensos registrados a 20 y 37°C (38.6 y 88.5%) para los isómeros *cis* de luteína fueron más suaves, concordantes con una posible tasa de isomerización *cis/trans* al igual que ocurre en otros procesados de alimentos vegetales como tomates y zanahorias (Chen *et al.*, 1995; Chen y Tang, 1998; Rubio-Díaz *et al.*, 2010). El estrés oxidativo fue claramente visualizado para all-*trans*-zeaxanteno y all-*trans*-β-caroteno alcanzándose, para ambos, niveles indetectables a partir del séptimo mes de muestreo a 50°C. Esto sugiere que ambos pigmentos minoritarios resultan menos termoestables que luteína a dicha temperatura ocurriendo antes su desaparición. Los estudios sobre estabilidad térmica en sistemas modelos y en almacenamientos en frutos o alimentos procesados indican que cada carotenoide se comporta de forma diferente a dichos tratamientos (Khachik *et al.*, 1992; Rubio-Díaz *et al.*, 2010). En algunos de estos trabajos all-*trans*-β-caroteno es indicado como el carotenoide más termolábil siendo además un factor agravante el bajo contenido hídrico (Goldman *et al.*, 1983; Henry *et al.*, 1998; Choe *et al.*, 2001; Nhung *et al.*, 2010).

Las fracciones esterificadas, por el contrario, mostraron un progreso en el que destacaron los aumentos modulados por la temperatura. Fueron especialmente relevantes, los que se produjeron tras el almacenamiento a 6 y 20°C (**Figura 165**). La fracción de monoésteres experimentó aumentos del 201 y 374% y la de ésteres totales de 233 y 575%, respectivamente. El comportamiento a las temperaturas 37 y 50°C reflejó una situación de competencia entre los aumentos (esterificación *de novo*) promovidos por la temperatura y la degradación debido justamente a las condiciones oxidativas desencadenadas por la intensidad de la misma, lo que finalmente hace observar una tendencia al descenso. Dicha tendencia se anticipa debido a las temperaturas aplicadas. Transcurrido el periodo de almacenamiento los monoésteres registraron a 37°C incrementos del 20% y la fracción total



de xantofilas esterificadas del 193%, lo que sugiere una contribución relevante de los diésteres, en esta última, para dicha temperatura. Esto revela una actividad esterificante intensa en harinas a 37°C. La generación de diésteres, observada como aumentos netos conforme incrementa la temperatura y el tiempo, fue propiciada por el aumento en el *pool* de monoésteres. Esto permite corroborar la existencia de síntesis de ésteres que tiene que acontecer mediante una ruta metabólica distinta a la que opera en granos intactos. Es importante reseñar que el proceso de esterificación de xantofilas en harinas de trigo duro fue ya advertido en las experiencias de almacenamiento corta (periodo de 3 meses). Los niveles trazas detectados impidieron una cuantificación de dichos ésteres. Esta situación no resulta equivalente a la presente, sin embargo, deja patente la relevancia de controlar las condiciones de almacenamiento de los cereales y productos derivados al demostrarse que éstas pueden alterar no sólo el contenido sino la composición de pigmentos carotenoides presentes en las mismas.

La síntesis *de novo* de xantofilas diesterificadas en harinas podría recaer en un tipo de enzimas como las lipasas (EC 3.1.1.3). Estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en semillas. En los cereales las lipasas se concentran en el salvado (Urquhart *et al.*, 1983), catalizando por definición la hidrólisis de enlaces carboxilo- éster y produciendo la consecuente liberación de ácidos grasos y alcoholes orgánicos. Sin embargo, en ambientes con poco contenido de agua pueden catalizar la reacción inversa (esterificación) o distintas reacciones de transesterificación en las que pueden intervenir ácidos, alcoholes y ésteres (Bornscheuer, 1995; Liaquat y Apenten, 2000; Barros *et al.*, 2010). La actividad acil transferasa atribuida a lipasas en experimentos de almacenamiento prolongado con harinas fue ya indicada, con respecto a la generación de ésteres de esteroides, en los trabajos de Farrington *et al.* (1981). Estos autores además indicaban una posible esterificación de luteína libre, al observar un mantenimiento a lo largo de la experiencia de las fracciones de monoésteres y diésteres de la misma, aunque los datos que obtuvieron no resultaron concluyentes. Resultados similares fueron obtenidos por Kaneko *et al.* (1995) durante el almacenamiento de granos de trigo. La tendencia de las lipasas a utilizar como sustratos a los ácidos grasos más abundantes en semillas (Hellyer *et al.*, 1999) y su resistencia a altas temperaturas (Kapranichikov *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2004), así como la existencia de trabajos recientes sobre esterificación de carotenoides por lipasas (Humeau *et al.*, 2000; Nakao *et al.*, 2008) podrían abalar la hipótesis que se plantea.

La comparación de la evolución de los perfiles de monoésteres y diésteres totales prueba una sucesión en la generación de ambos tipos de moléculas, siendo la formación de diésteres totalmente dependiente de los niveles de monoésteres (**Figura 165**). La generación de diésteres a partir del octavo y cuarto mes a las temperaturas 6 y 20°C,

respectivamente, cuando los monoésteres alcanzaron niveles considerables, así como la no existencia a -32°C , así lo indican. En términos relativos (**Figura 166**) se observa claramente lo expuesto con anterioridad reflejándose además a 50°C , al final del periodo analizado, una disminución de la ruta sintética de pigmentos esterificados consecuente con la degradación de carotenoides que domina a esa temperatura.

Con respecto al análisis de pigmentos libres individuales en tritordeum (**Figura 167; Tabla A32**) las pérdidas registradas a lo largo del almacenamiento cursaron de forma similar en todos los pigmentos. A 37°C se registraron pérdidas en un rango de 83-98 % para los pigmentos libres presentes, *all-trans*-luteína, *cis*-luteína y β -caroteno. Como se comentó con anterioridad, es habitual que trascurrido el almacenamiento a 50°C , los efectos se resuman como pérdidas totales, siendo llamativo el resultado para β -caroteno, el cual es indetectable a partir del cuarto mes de almacenamiento. En las muestras de trigo este carotenoide también se mostraba más susceptible a dicha temperatura. β -Caroteno es descrito en la literatura como un carotenoide que actúa de forma activa como antioxidante en el sistema lipoxigenasa-linoleico. Algunos estudios realizados a tal efecto han encontrado una actividad incluso inhibidora de la enzima por parte de dicho carotenoide (Lomnitski *et al.*, 1993; Trono *et al.*, 1999; Serpen y Gökmen, 2006). La actividad antioxidante se encuentra asociada a la propia oxidación del pigmento lo que podría explicar dicha disminución en sus niveles (Yanishlieva *et al.*, 1998) apuntando a la existencia de un estrés oxidativo considerable.

El análisis de las fracciones esterificadas permitió observar, a diferencia de lo apuntado para trigo duro, diferencias en el perfil de evolución entre monoésteres y diésteres, obteniéndose una situación intermedia para la fracción de ésteres totales (**Figura 167**). La fracción monoesterificada total siguió la pauta general de descensos conforme aumento la temperatura similar al observado para los pigmentos en estado libre, aunque los descensos a la temperatura de 20 y 37°C fueron del 18 y 78%, respectivamente. Por el contrario, la fracción diesterificada total presentó un comportamiento similar a las fracciones esterificadas en trigo duro, produciéndose aumentos del 7, 60 y 63% a las temperaturas 6, 20 y 37°C , respectivamente. Estos resultados podrían indicar una diferencia de actividad enzimática de lipasas en ambos cereales, siendo mayor para el caso de trigos. La carga genética procedente de cebada silvestre (*H. chilense*) que presenta tritordeum podría ser responsable de estas diferencias de actividad encontrada al contener distintas isoformas de dichas enzimas. Los ensayos comparativos de actividad de lipasas indican que ésta puede variar en gran medida entre semillas (Matlashewski *et al.*, 1982; O'Connor *et al.*, 1992; Liaquat y Apenten, 2000) por lo tanto los granos sometidos a estudio podrían diferenciarse también en este carácter.



El análisis de los resultados expuesto podría implicar que las harinas de tritordeum presentan una situación más proclive a la pérdida de carotenoides debido a que probablemente el medio o matriz presente o provoque un mayor estrés oxidativo. Basta observar que en tritordeum all-*trans*-luteína registró unas pérdidas superiores que trigo duro a las temperaturas de -32, 6, 20 y 37°C. Estos aspectos serán discutidos más adelante en el análisis cinético realizado para harinas.

5.9.3.1. Evolución y estabilidad de las fracciones de luteína esterificada durante el almacenamiento prolongado de harinas de trigo duro y tritordeum.

La evolución del contenido de monoésteres en trigo duro, monolinoleato y monopalmitato, fue concordante con lo anteriormente descrito con respecto a la fracción de ésteres totales (**Figura 168**). Las mermas y ganancias en términos relativos al final del periodo de almacenamiento fueron coincidentes para ambos tipos de monoésteres para todas las temperaturas ensayadas, excepto para 37°C. Dicha temperatura junto con la de 50°C se caracterizaron por presentar un perfil de evolución con dos zonas bien diferenciadas, síntesis y degradación, por lo que en este caso el análisis resultó más útil atendiendo a dichas zonas más que visualizando el global. La **Tabla 34** recoge los fenómenos de síntesis y degradación, cuantificados en porcentajes, que acontecen a todas las temperaturas en las fracciones de monoésteres así como también para sus correspondientes regioisómeros. Para el caso de luteína monolinoleato a 37°C la síntesis genera un aumento del 340% trascurridos los 2 primeros meses, seguido de degradación del 78% en los sucesivos meses. A 50°C el máximo de síntesis se observó transcurrido 1 mes del inicio siendo del 279%, para posteriormente llegar al agotamiento al final del almacenamiento. Para el caso de luteína monopalmitato, a 37°C se registró síntesis incrementando el 930% a los dos meses de almacenamiento, con la consiguiente degradación en un 80% hasta el final del experimento. A 50°C la situación fue similar produciéndose aumento en un 796%. Los fenómenos biosintéticos y degradativos descritos indican diferencias para ambos monoésteres. Los porcentajes de degradación a 37 y 50°C fueron similares en ambos, sin embargo, los incrementos reflejaron una diferencia superior para el monoéster con ácido palmítico. Esto implica que la degradación no está influida en harina por el ácido graso que este unido, como así lo demuestra también el ratio luteína monopalmitato/luteína monolinoleato que nunca se invirtió a lo largo del almacenamiento (**Figura 169**). Con respecto a los aumentos, la actividad lipasa podría presentar mayor especificidad por ácido palmítico o tener a éste más disponible como sustrato debido a la susceptibilidad del linoleico a oxidarse tanto de forma directa como mediado por



lipoxigenasa (Siedow, 1991). Las lipasas tanto de origen vegetal, animal o procedente de microorganismos muestran una amplia variedad de especificidades de sustratos. La literatura recoge ejemplos no solo específicos a una clase de lípidos sino por un ácido graso o a nivel de regio- o estereoselectividad (Jensen, 1974; Hills y Mukherjee, 1989; Rahmatullah *et al.*, 1994; Ncube *et al.*, 1995; Jachmanián *et al.*, 1996). Estas características han sido utilizadas para obtener fracciones purificadas en ácidos grasos, sustancias de alto valor añadido, síntesis o hidrólisis de ésteres de interés, etc., constituyendo un conjunto de enzimas muy utilizadas en la industria biotecnológica (Miller *et al.*, 1988; Bornscheuer, 1995; Gandhi, 1997). En semillas de vegetales, salvo excepciones que porten ácidos grasos inusuales, lo normal sin embargo, es que presenten un rango de ácidos grasos como sustratos coincidentes generalmente con los más abundantes en el *pool* lipídico (Berger y Schneider, 1991; Lin *et al.*, 1986; Huang *et al.*, 1988; Hellyer *et al.*, 1999). En base a lo anterior los datos presentados podrían deberse más bien no ha una especificidad por el ácido palmítico, ya que también se observa la síntesis de ésteres con ácido linoleico, sino más bien a una producción disminuida de éstos por oxidación del sustrato. Estos resultados son también coincidentes con las mediciones de actividad de lipasas en distintos cereales realizados por O'Connor *et al.* (1992). Estos autores observaron que no existen preferencias por ácidos grasos específicos tanto en trigo como avena y que linoleico es igualmente detectado en niveles inferiores al oxidarse. La similitud de los porcentajes de degradación entre ambos monoésteres (**Tabla 34**) estaría implicando una protección de los ácidos grasos una vez que éstos están unidos a luteína. Este aspecto fue ya apuntado en las harinas almacenadas durante tres meses, indicando que la interacción ácido graso-carotenoide podría proporcionar un efecto protector para ambos. Existen estudios como los de Hildebrand (1989) y Hildebrand *et al.* (1990) en los que los autores concluyen que generalmente las enzimas lipoxigenasas, presentan actividad por ácidos grasos libres, es decir, que todas las lipoxigenasas en mayor o menor medida procesan ácido linoleico libre aunque no todas con la misma eficiencia. El análisis de regioisómeros (**Figura 170**) permite establecer diferencias para ambas posiciones en la molécula de luteína aunque mostrando una pauta general similar para los dos monoésteres. La posición 3' parece ser preferente en la esterificación de luteína mediada por lipasas, y más estable atendiendo a los porcentajes de síntesis y degradación a 37 y 50°C (**Tabla 34**). Esto corrobora, lo ya observado en el estudio preliminar de harinas, indicando claramente que los sistemas enzimáticos implicados en la esterificación en harinas son distintos de los que operan en granos intactos.

Con respecto a los diésteres, al igual que monoésteres, éstos siguen la misma evolución descrita para la fracción de diésteres totales, siendo muy acusados los aumentos



netos registrados a 20°C (**Figura 168**). Dichos aumentos fueron intensos para los diésteres conteniendo ácido linoleico en su estructura. La composición de partida de las harinas integrales sometidas a estudio presentaba un mayor contenido en monoésteres con ácido linoleico (**Tabla 33**) lo que podría justificar tales resultados. Luteína dilinoleato destacó presentando unos mayores aumentos frente a luteína linoleatopalmitato lo que corrobora una mayor afinidad por linoleico, e indica que la mayor síntesis de monoésteres con ácido palmítico (**Tabla 34**) se deba probablemente a una menor disponibilidad en el medio de ácido linoleico al ser más propenso a la termooxidación. La evolución del contenido en diésteres para las temperaturas 37 y 50°C pudieron ser descompuestas en periodos de síntesis y degradación neta, constituyendo ésta última a 37°C entre un 54-60% menor que la degradación de monoésteres.

El estudio de la fracción esterificada en tritordeum reflejó una situación diferente a la observada en trigo duro. En la interpretación de los datos que se exponen a continuación se debe tener en cuenta dos aspectos. Por un lado, que tritordeum es una especie de cereal donde el aporte del genoma de cebada silvestre (*H. chilense*) y su interacción con el de trigo duro debe influir en la aparición de las diferencias de comportamientos observada, estando probablemente relacionada con este aspecto la menor actividad esterificante en harinas atribuida a lipasas. Por otro lado, la desigual distribución inicial de las fracciones libre (57% en tritordeum y en 97% trigo duro) y esterificada de luteína (43% para tritordeum y 3% para trigo duro) en ambos cereales (**Tabla 33**).

La evolución del monoéster con ácido linoleico indicó una constancia en el contenido para las temperaturas -32, 6 y 20°C (**Figura 171**). En el caso de luteína monopalmitato el comportamiento mostró una disminución más progresiva conforme aumenta la temperatura y el tiempo aunque siempre inferiores a las registradas para all-*trans*-luteína. La comparación de ambas moléculas indicó una diferencia de estabilidad entre los dos monoésteres. Los porcentajes de degradación a 37°C siendo mayores para luteína monopalmitato (85%) que para luteína monolinoleato (65%) y la inversión de los ratios luteína monopalmitato/luteína monolinoleato a lo largo del almacenamiento a 37 y 50°C (**Figura 169**) demuestran la diferencia de estabilidad entre ambos. Con respecto al análisis de regioisómeros, las posiciones 3' en la molécula de luteína se tradujo, al igual que en trigo duro, en compuestos con una mayor estabilidad (**Figuras 169 y 172**). Estas diferencias fueron más acusadas para la pareja de regioisómeros de luteína monolinoleato, en el que los comportamientos a las temperaturas de 6, 20 y 37°C resultan muy dispares. Cabe destacar en ambos monoésteres la evolución observada durante el almacenamiento a 20°C. Así se produjeron aumentos para los monoésteres en las posiciones 3', mientras que los regioisómeros en la posición 3 experimentó descensos. Así para el caso de luteína-



3'-*O*-linoleato se produce un aumento del 125.6% a diferencia de luteína-3-*O*-linoleato que registra un descenso del 23%. Para luteína-3'-*O*-palmitato los valores se mantuvieron constantes (aumento del 2.6%), mientras que luteína-3-*O*-palmitato tuvo una reducción 51.5%. El grupo de diésteres mostró también una mayor retención por parte de las moléculas esterificadas con ácido linoleico, como así lo reflejan las pérdidas observadas tras los 12 meses de almacenamiento (**Figura 171**). Luteína dilinoleato y luteína linoleatopalmitato presentaron una evolución similar observándose aumentos a 6, 20 y 37°C similares al comportamiento de diésteres en trigo duro. Sin embargo, luteína dipalmitato presenta un comportamiento distinto produciéndose pérdidas netas a todas las temperaturas, aunque al igual que luteína monopalmitato, este registró descensos menores a las temperaturas 20°C (22.7%) y 37°C (53.7%) con respecto al pigmento en estado libre.

5.9.3.2. Estudio cinético de la evolución del contenido y composición de pigmentos carotenoides durante el almacenamiento prolongado de harinas de trigo duro y tritordeum.

La evaluación de la velocidad de degradación de carotenoides en harinas integrales almacenadas a distintas temperaturas se realizó ajustando los datos experimentales tanto a una cinética de orden cero como de primer orden. Las **Tablas 35-38** muestran los resultados del ajuste a ambos modelos cinéticos para los pigmentos totales e individuales. Los datos demuestran que el modelo de primer orden se ajusta mejor a los datos de evolución de pigmentos. Es importante indicar que a las temperaturas inferiores, -32 y 6°C, los ajustes obtenidos por lo general, tanto para pigmentos en estado libre como los totales, no resultan idóneos siendo por tanto datos obviados a la hora de analizar los resultados cinéticos. Al igual que los datos obtenidos para granos, el comportamiento de los pigmentos esterificados no permite realizar un estudio cinético completo y exhaustivo. La repercusión de tal estado de esterificación de los pigmentos puede ser indirectamente evaluada en un ejercicio comparativo entre fracciones libres y totales para ambos cereales, así como en el estudio de las constantes de velocidad (k) obtenidas para algunas temperaturas que se indicarán a continuación.

El análisis para pigmentos libres (**Tabla 37**) reveló diferencias entre ambas especies de cereales. Para el caso de tritordeum la velocidad de la reacción fue más alta para todos los pigmentos a las temperaturas 20, 37 y 50°C, siendo β -caroteno una excepción. A 50°C los valores de k para todas las xantofilas presentes resultó ser aproximadamente del doble en tritordeum con respecto a trigo duro. La estructura del propio pigmento, así como el medio oxidante, dependiendo de la matriz en la que se encuentre, unido a la pérdida de compartimentación celular son factores que deben de estar influyendo en tal resultado. En



relación al medio, tritordeum podría presentar en sus harinas una actividad lipoxigenasa residual mayor comparada con la de trigo duro. La actividad enzimática Lox que presente el grano es un compendio no solo del nivel de expresión de los transcritos, de los distintos genes Lox, y mecanismos postransduccionales existentes durante el desarrollo del mismo, sino también de las propiedades bioquímicas de las distintas isoformas que finalmente presente (De Simone *et al.*, 2010). Todo esto genera una variabilidad en el nivel de actividad la cual ha quedado reflejada en trabajos como los de Leenhardt *et al.*, 2006a; Žilić *et al.*, 2010 y Hidalgo y Brandolini, 2012. Estos estudios establecen que los trigos tetraploides (trigo duro *T. turgidum* L. subsp. *durum*) presentan menor actividad Lox que trigos hexaploides (trigo harinero *T. aestivum* L.) y a su vez los trigos diploides (einkorn, *T. monococcum* L.) menor que ambos. Al igual que las características harino-panaderas de tritordeum que resultan ser más próximas al trigo harinero que al trigo duro (Álvarez *et al.*, 1992; 1994; Martín *et al.* 1999), la actividad Lox también podría relacionarse en este sentido. En un estudio reciente realizado con sémola comercial para medir la pérdida de carotenoides durante la obtención de pasta (Panfili *et al.*, 2005) se describió que las pérdidas eran más acusadas cuando se parte de muestras basadas en mezclas enriquecidas con cebada. Hay que tener también en cuenta la degradación asociada al proceso de molienda, el cual puede afectar de forma distinta a cada cereal y el almacenamiento y las condiciones medioambientales al que fue expuesto cada uno (Borrelli *et al.*, 1999), como fue comentado al inicio de estas experiencias con granos y harinas. La importancia de las condiciones de almacenamiento en el desencadenamiento de eventos metabólicos en los granos y derivados ha quedado patente en la presente memoria. Otro factor que pudiera estar influyendo es la presencia de otros antioxidantes en mayor proporción en trigo duro que pudieran estar produciendo un efecto sinergista o protector para carotenoides. El efecto sinergista entre tocoferoles y carotenoides ha sido apuntado por diversos autores siendo habitual los trabajos en los que analizan los cambios o interacción entre ambos durante el procesamiento de cereales (Pastore *et al.*, 2000; Hidalgo *et al.*, 2006; 2009b; Leenhardt *et al.*, 2006b; Fratianni *et al.*, 2012). Sin embargo, la carencia de dicha información en tritordeum nos impide discutir al respecto. Con respecto a cada cereal, para trigo duro los valores obtenidos de *k* son similares tanto para xantofilas como para carotenos (β -caroteno) aunque con algunas excepciones. *all-trans*-Zeaxanteno se mostró como el pigmento que se degradó más rápidamente para todas las temperaturas. El dato a 50°C es destacable y concordante con las pérdidas registradas a dicha temperatura anulándose a partir del séptimo mes (**Figura 165**). Tritordeum presentó diferencias más patentes entre ambos grupos de pigmentos siendo los valores obtenidos para β -caroteno más bajos a 20, 37 y 50°C. Estos resultados están en consonancia con



trabajos de Dhuique-Meyer *et al.* (2007) en los que se describen también velocidades de degradación más reducidas para β -caroteno con respecto a xantofilas.

Los datos obtenidos para las fracciones totales (conteniendo los esterificados) posibilitan nuevamente inferir que la reacción transcurre más acelerada en tritordeum que en trigo duro como así lo indican los valores de k a 50°C (**Tabla 38**). Los datos obtenidos se contraponen a resultados de Hidalgo y Brandolini (2008b). Estos autores realizaron uno de los pocos trabajos que existe sobre el comportamiento de carotenoides y su sensibilidad térmica a lo largo del almacenamiento de harinas de trigo. Hidalgo y Brandolini efectuaron su estudio con harinas tanto refinadas como integrales procedentes de dos variedades de trigo diferentes y que presentaban disparidad en el contenido carotenoides. Estos autores obtuvieron una velocidad de degradación menor en la especie que presenta mayor nivel de pigmentos apuntando, junto con otros factores, el aporte de pigmentos inicial como una característica importante responsable de un mayor porcentaje de retención de los mismos. La cinética de degradación cursó según un modelo de primer orden. La comparación entre pigmentos libres y totales para trigo duro indica algunas diferencias a 20, 37 y 50°C, consistente con el aporte de ésteres en los totales. Los valores de k a dichas temperaturas resultan ser siempre inferiores. Para tritordeum este efecto es más acusado facilitado por el mayor nivel de pigmentos que presenta. Para el caso de 37°C esa diferencia resultó ser tres veces menos para ambas fracciones totales, luteína y carotenoides totales, con respecto a las xantofilas libres.

El análisis detallado de las constantes de velocidad (k) para los pigmentos esterificados y regioisómeros se resume en la **Tabla 39**. En trigo duro, la velocidad de degradación de monoésteres, similares para ambos tipos, a 37 y 50°C se aproxima a la de luteína libre. A su vez las constantes de velocidad de los diésteres fueron menores a las de los monoésteres y los pigmentos libres, traduciéndose en una mayor termoestabilidad de los mismos. En relación a los regioisómeros de los monoésteres de luteína, fueron las formas esterificadas en la posición 3' las que presentaron velocidades de desaparición ligeramente inferiores a las formas esterificadas en la posición 3. En términos generales, exceptuando a los diésteres, el análisis en trigo duro no arrojó diferencias tan acusadas como se esperaría entre pigmentos libres y esterificados (**Tabla 37**). Esto podría indicar que en este caso el estado de esterificación del pigmento no estaría influyendo de forma significativa en una velocidad de degradación más ralentizada para la molécula de carotenoide. Por el contrario, hay que tener en cuenta el recambio del grupo de monoésteres y paso al *pool* de diésteres debe ser la causa principal de esta aparente mayor desaparición de los primeros que llega a ser equiparable a la de un pigmento en

estado libre, siendo además la fracción de monoésteres de gran peso en la de ésteres totales.

En el caso de tritordeum los datos revelaron diferencias más patentes en función del estado (libre o esterificado) de la molécula de luteína (**Tabla 39**). La comparación entre moléculas esterificadas de luteína (mono- y diesterificadas) y luteína libre implica una velocidad de degradación menor para las primeras, incluso a 50°C, a pesar de las intensas condiciones degradativas que se producen a dicha temperatura. El comportamiento a 37°C arrojó mayores diferencias. Así luteína-3'-*O*-monolinoleato mostró una velocidad de degradación del orden de tres veces menor con respecto a luteína libre. Dentro del grupo de monoésteres, luteína monolinoleato presentó velocidades de degradación más lentas que luteína monopalmitato, así como también las moléculas esterificadas en posición 3' frente a aquellas en posición 3 para cada una de las parejas de regioisómeros. Estos datos están en consonancia con lo descrito anteriormente en el apartado de evolución de las fracciones esterificadas. Con respecto al grupo de diésteres éstos mostraron las velocidades de degradación más reducidas a 50°C no existiendo diferencias entre los distintos diésteres presentes. Como anteriormente se ha expuesto en el análisis comparativo entre fracciones totales y pigmentos libres, las fracciones esterificadas indicaron también una mayor velocidad de degradación en tritordeum, siendo para diésteres del doble a 50°C con respecto a trigo duro. La acción de las lipasas en trigos sobre todo en dicho grupo pudiera estar influyendo en esa diferencia de velocidad, siendo la reposición de diésteres importante frente a la degradación. Además de la presencia o ausencia de sustancias oxidantes o prooxidantes que pueda estar presentes en ambas harinas desencadenando finalmente dicho resultado. Tritordeum puede presentar, como se comentó con anterioridad, mayor actividad Lox (De Simone *et al.*, 2010). La mayoría de los estudios de caracterización de isoenzimas de Lox se ha realizado en semillas de leguminosas concretamente a partir de cotiledones de semillas de soja, concluyendo la existencia de tres isoenzimas de características bioquímicas distintas en semillas maduras, Lox-1, Lox-2 y Lox-3 (Siedow, 1991; Porta y Rocha-Sosa, 2002). Lox-1 actúa frente a ácidos grasos libres siendo linoleico el sustrato preferente, sin embargo Lox-2 y Lox-3 presentan más afinidad por ácidos grasos esterificados aunque actúan también sobre ácidos grasos libres. La actividad de isoenzimas de Lox con respecto a ácidos grasos esterificados ha sido probada en diversos trabajos (Morrison y Panpaprai, 1975; Feussner *et al.*, 2001; Stelmach *et al.*, 2001; Garbe *et al.*, 2006). Además Lox-3 se indica en la literatura como la isoenzima más activa hacia la generación de reacciones secundarias como es la co-oxidación de carotenoides (Ramadoss *et al.*, 1978). Tritordeum, presentaría así una situación más desfavorecida cinéticamente hablando, tanto si el pigmento esta libre

como esterificado, algo que dista de la situación comentada anteriormente para los granos intactos.

Los valores de $t_{1/2}$ y D (**Tablas 37 y 38**) estuvieron en consonancia con lo expuesto con anterioridad mostrando valores más elevados para trigo duro. No obstante, los valores obtenidos para las fracciones totales revelaron a la temperatura de 37°C una situación opuesta en la que la harina de tritordeum presenta mayores valores de vida media. Este dato es concordante con las pérdidas registradas al final del almacenamiento para carotenoides totales (**Figura 163**) siendo éstas a 37 °C inferior para tritordeum que para trigo duro.

5.9.4. Efecto del procesado sobre la evolución del perfil de pigmentos carotenoides durante el almacenamiento prolongado de granos y sus correspondientes harinas en trigo duro y tritordeum.

Los estudios de estabilidad y cinética de degradación que han sido expuestos con anterioridad han dejado patente una situación diferenciable entre granos y sus correspondientes harinas para las muestras de cereales estudiadas. El análisis comparativo entre ambas situaciones tiene como objetivo afianzar conclusiones importantes sobre la matriz alimentaria y la repercusión de su procesado en la estabilidad y por consiguiente en el aporte de carotenoides finalmente por parte de estos alimentos básicos.

5.9.4.1. Análisis comparativo entre la evolución del contenido y composición de pigmentos carotenoides durante el almacenamiento prolongado de granos y sus correspondientes harinas en trigo duro.

La comparación de la evolución para carotenoides totales (**Figuras 152 y 163**) en trigo duro permite observar una pérdida más paulatina y ralentizada con el aumento de la temperatura en granos intactos que en harinas. Aunque las pérdidas resultaron ser totales a 50°C, debido a la intensificación de la condiciones degradativas para ambas situaciones, el comportamiento a las restantes temperaturas fue diferente. Paradójicamente, en los granos las pérdidas a -32 y 6°C fueron mayores (27 y 30% respectivamente) que en harinas (7 y 8%), aunque en ambos casos dichas temperaturas se comportan muy similares. Estos datos no se deben a un mayor nivel de carotenoides de partida en harinas, debido a una extracción más favorecida, ya que los valores son similares a granos (**Tablas 25 y 33**). Aunque si podría deberse a una mayor homogenización de la muestra. Por otro lado, los



aumentos de ésteres que acontecen a 6°C en harinas podría explicar a nivel global esa disminución en las pérdidas pero no las que se registran a -32°C ya que a esta temperatura no ocurre síntesis de esteres. Además, como se comentó con anterioridad para granos, resulta inusual que ambas temperaturas registren cifras próximas algo que en harinas también se observa. Para el caso de estas últimas, los resultados obtenidos igualmente no pueden ser atribuidos a fluctuaciones en el registro de las temperaturas como puede apreciarse en la **Figura 153**. La situación a 20°C también deporta para granos mayores pérdidas. El comportamiento a 37°C en granos resultó ser más favorable que en harinas al registrar pérdidas menores que estas últimas (77% frente a 84%). Este primer análisis permite advertir la inestabilidad que presentan las muestras de harinas, siendo los cambios entre temperaturas más bruscos que en granos, en los cuales éstos son más amortiguados (Wang y Flores, 1999; Brandolini *et al.*, 2010).

Los pigmentos libres (**Figuras 154 y 165**) reflejaron en ambos casos una situación parecida a la fracción total registrando porcentajes de reducción del contenido carotenoides similares, tanto a -32 como a 6°C. La temperatura de 20°C si supone diferencia ya que se produjeron siempre pérdidas superiores para todos los pigmentos libres en harinas. Esta diferencia observada, con respecto al sumatorio de carotenoides, estriba en la compensación en las pérdidas de éste último por los aumentos de ésteres, algo que no ocurre de forma tan acusada en granos. La evolución a 37°C estuvo asociada por lo general con pérdidas más acusadas y próximas al agotamiento en harinas. A 50°C el comportamiento de los distintos pigmentos fue bastante similar tanto en granos como harinas, destacando en éstas últimas zeaxanteno y β -caroteno.

Las fracciones esterificadas presentaron en ambos casos, granos y harinas, fenómenos de síntesis acompañados de degradación coexistiendo de forma competitiva, (**Figuras 154 y 165**). Los fenómenos sintéticos, aunque de naturaleza enzimática distinta en cada caso, son los responsables de una disminución en la intensidad degradativa traduciéndose finalmente en una mayor retención de estos pigmentos a lo largo del almacenamiento tanto en granos intactos como procesados. No obstante, la comparación entre las dos situaciones sugiere un ambiente distinto. En granos la tendencia general para la fracción de ésteres totales fue a la disminución conforme aumenta el tiempo y la temperatura pero dicha degradación se vio amortiguada por unos incrementos los cuales se intensificaron a 37°C. Como resultado de esto, al final del almacenamiento a 37°C se observaron pérdidas de pigmentos de tan sólo el 25% (75% a 50°C). Estos datos avalan el papel protector de la esterificación sobre los pigmentos a la vez que proporcionan indicios de una actividad enzimática esterificante *in vivo* modulada por la temperatura (**Figura 156**). En harinas el medio que rodea a los pigmentos es más agresivo ya que las condiciones no



solo propician la oxidación directa de éstos (Anderson *et al.*, 2011) sino además facilita la actuación de enzimas degradativas como polifenol oxidasas, peroxidasas, lipoxigenasas y lipasas (Rani *et al.*, 2001) al favorecerse el contacto entre éstas y sus sustratos. La inestabilidad de las harinas, en especial las integrales al contener las fracciones del grano con mayor aporte lipídico, como es el germen, es un factor relevante para la industria harino-panadera (Prabhasankar y Rao, 1999; Pareyt *et al.*, 2011). Es importante controlar la degradación de la materia grasa para conseguir un producto viable y aceptable por el consumidor tras el almacenamiento prolongado, evitando además la pérdida de nutrientes esenciales del grano (Galliard, 1994; Nanditha y Prabhasankar, 2009; Doblado-Maldonado *et al.*, 2012). Este ambiente oxidante que se describe queda reflejado inclusive para las fracciones esterificadas anulándose las mismas, a diferencia de la situación en granos, trascurrido el almacenamiento a 50°C (**Figura 155**). No obstante, a pesar de estas condiciones, el comportamiento observado en harinas refleja una actividad esterificante importante. Esto se observa para las temperaturas de 6 y 20°C a lo largo de todo el periodo de almacenamiento, y para las temperaturas de 37 y 50°C al inicio de ésta donde las condiciones degradativas todavía no se han agudizado debido al poco tiempo transcurrido. Esta situación intensa de síntesis enmascara el comportamiento esperable para harinas en las condiciones de almacenamiento impuestas, donde el fenómeno debería ser por excelencia catabólico (Schweiggert *et al.*, 2007; Fu *et al.*, 2010; Mertz *et al.*, 2010). Bajo estas condiciones en trigo duro resultó complicado evaluar la capacidad que deporta para el pigmento el estar esterificado en términos estructurales, estrictamente de estabilidad, y como se afecta por el procesado del cereal. Esto implica que ambas situaciones, granos y harinas, resultarán próximas aunque, como se verá a continuación a nivel cinético, si se observará la ventaja de que el cereal presente en su composición una mayor proporción de carotenoides esterificados. En relación a la biosíntesis de ésteres en harinas, es destacable en primer lugar el comportamiento a 37°C, que a pesar de tratarse de una temperatura a la que se esperaría registrar pérdidas conforme avanza el tiempo de almacenamiento, como en el caso de granos, en harinas se resume como aumentos tanto para la fracción de monoésteres como ésteres totales (**Figura 165**). Y en segundo lugar, la generación de diésteres con la temperatura y debido al *pool* de monoésteres. La actividad sintética que se registra debe sin duda ser distinta a la que opera *in vivo*. Como se hipotetizó con anterioridad la síntesis en este caso podría sugerir la acción de enzimas tipo lipasas las cuales intensifican su actividad conforme el ambiente se hace más deshidratado (Golberg *et al.*, 1990; Khan *et al.*, 1990; Svensson *et al.*, 1994). El incremento de temperatura propició justamente esto lo que explicaría el comportamiento dual, síntesis y degradación, a 37 y 50°C en la evolución para las dos fracciones de ésteres de luteína (monoésteres y



diésteres). Esto indica que la síntesis de ésteres en este caso no es termoselectiva como en granos ya que acontece a todas las temperaturas, incluso a 50°C, pero sí es específica en cuanto a los sustratos lipídicos implicados.

Con respecto a los monoésteres presentes, tanto luteína monolinoleato como monopalmitato presentaban en granos un comportamiento donde la tendencia general fue a la amortiguación de las pérdidas. Esta característica fue aún más patente para luteína monolinoleato, presentándose como el monoéster más estable (**Figuras 158**). En cambio, la situación en harinas fue muy distante a la de granos, en especial a las temperaturas 6 y 20°C, resultando más acusada para el monoéster con ácido palmítico (**Figuras 168**) debido probablemente a una mayor disponibilidad de dicho ácido graso. La pérdida de integridad celular que existe en harinas hace que la estabilidad de ambos monoésteres resulte ahora similar, como se deduce de los porcentajes de pérdidas obtenidos para ambos casos al final del periodo de almacenamiento (**Tabla 34**). Estos datos indican que es el estado de la matriz el factor condicionante y responsable de la menor estabilidad que presenta luteína monolinoleato en harinas. La influencia de la matriz en la estabilidad de carotenoides es un factor que ha sido apuntado como muy relevante por numerosos autores (Ribeiro y Schubert, 2003; Ferreira y Rodríguez-Amaya, 2008). Resulta interesante, y contrario a algunos trabajos, los datos obtenidos en el presente estudio para harinas ya que en estas condiciones sería esperable encontrar una mayor inestabilidad por parte de los ésteres con ácido linoleico que con palmítico, dada la naturaleza poliinsaturada del primero (Biacs *et al.*, 1989; Subagio *et al.*, 1999; Pérez-Gálvez y Mínguez-Mosquera, 2002 a,b).

La transformación de grano en harina mediante molienda conllevó también algunos cambios destacables a nivel del comportamiento de los respectivos regioisómeros, indicando que la susceptibilidad a la degradación de los ésteres de luteína en la dos posibles posiciones de la molécula se ven también afectadas por el procesado del cereal (**Figuras 160 y 170**). Para el caso de los regioisómeros de luteína monolinoleato en granos, fue el regioisómero en posición 3 el que manifestó una intensa actividad de síntesis, registrando aumentos sobre todo a 37°C, concordante con la regioselectividad de las enzimas XAT por dicha zona de la molécula. Sin embargo se debe destacar que a 50°C fue el regioisómero en posición 3' el más estable. En harinas esta característica se mantiene, siendo también éste regioisómero (luteína-3'-*O*-linoleato) el más estable, indicando la preferencia de las lipasas por la posición 3' del anillo ϵ de luteína en la reacción de esterificación. Los aumentos registrados a 20 y 37°C al final de la experiencia y los porcentajes de síntesis también a esa última temperatura así lo indican (**Tabla 34**). Con respecto a la pareja de regioisómeros con ácido palmítico la influencia de la matriz es aún mayor, ya que en granos ambas posiciones de la molécula resultaban equivalentes. En



harinas, fue el regioisómero en posición 3' el que resulta con mayor estabilidad teniendo en cuenta los aumentos finales registrados a 20 y 37°C (**Figura 170**) y los porcentajes de síntesis y degradación (**Tabla 34**), lo que se traduce en una inversión de los ratios 3/3' conforme progresó el experimento (**Figura 169**).

En términos cinéticos la comparación para carotenoides libres, permite observar algunas diferencias que merecen ser destacadas (**Tablas 30 y 37**). Como era de esperar los valores de k resultaron ser superiores en harinas siendo dicho efecto más acusado a las temperaturas 37 y 50°C. Los resultados a ésta última no son tan homogéneos existiendo discrepancias entre los pigmentos presentes, referidas más bien a la estructura del propio carotenoide y no al estado de la matriz donde se encuentren (Jørgensen y Skibsted, 1993; Mortensen y Skibsted, 1997). *all-trans*-Zeaxanteno y β -caroteno presentaron una diferencia importante en los valores de k a 50°C. Estos datos son consecuentes con las pérdidas más anticipadas que registraban ambos pigmentos finalizado el experimento en harinas (**Figura 165**). Con respecto al resto de pigmentos (*all-trans*-luteína, luteína libre total, *cis*-luteína y carotenoides libres totales) los valores de k no presentaron diferencias tan acusadas. Esto implica que la velocidad de degradación no estaría tan influenciada por el procesado para los pigmentos libres. Conclusiones similares donde la influencia del estado de la matriz no repercute en la estabilidad del carotenoide a una temperatura dada fue también observado por Fish y Davis (2003) en un estudio realizado con tejido de melón cortado y molido.

La situación para las fracciones totales (**Tablas 31 y 38**), conteniendo los pigmentos esterificados, fue distinta permitiendo observar que para dichas fracciones a 20 y 50°C la velocidad en harinas resultó ser inferior. A 37°C, y concordante con el aumento de la ruta de esterificación en granos, la situación fue opuesta. Este efecto se debe al porcentaje de pigmentos que se encuentran esterificados para ambas situaciones a cada temperatura. Es decir los resultados obtenidos están totalmente influenciados por la síntesis de ésteres que acontece en ambas situaciones y es el responsable de no advertir el efecto del procesado sobre el pigmento esterificado. Los aumentos registrados a 20 y 50°C que no acontecían en los granos pero si en harinas avalan también esta hipótesis. En cualquier caso, esto permite comprobar, como fue introducido con anterioridad, que la esterificación deporta un freno en la degradación siendo importante obtener cereales donde las condiciones propicien que una mayor proporción de pigmentos carotenoides se encuentren esterificados. Estos datos visualizados en términos de vida media ($t_{1/2}$) y D son importantes. Para una temperatura de almacenamiento como 20°C y teniendo en cuenta que se trata de harinas sin refinar, luteína total presenta unos valores de $t_{1/2}$ y D de 26 y 86 meses respectivamente frente a los obtenidos para granos cifrados en 15 y 49 meses.



Con respecto a las fracciones y pigmentos esterificados (**Tablas 32 y 39**) el análisis en este caso da una visión más precisa del efecto del procesado del alimento debido a que se trata de fracciones minoritarias. Los valores de k para todas las temperaturas obtenidas y pigmentos presentes se mostraron mayores para harinas. Esto es consistente con los datos expuestos con anterioridad y la naturaleza de las matrices analizadas. La fracción de monoésteres total presentó a 37 y 50°C valores de k para granos 6 y 3 veces inferior que sus homólogos en harinas, respectivamente. Para el caso de los regioisómeros algunas comparaciones pueden ser establecidas. El regioisómero en posición 3' de luteína monolinoleato presentó a 50°C un valor de k en torno a 4 veces inferior en grano con respecto harina. Así mismo, para el caso de los regioisómeros de monopalmitato ambos mostraron a 37 y 50°C unos valores de k en torno a 3 y 2 veces inferior en granos con respecto a harinas.

5.9.4.2. Análisis comparativo entre la evolución del contenido y composición de pigmentos carotenoides durante el almacenamiento prolongado de granos y sus correspondientes harinas en tritordeum.

La visión que proporciona la comparación para la evolución de carotenoides totales entre granos y harinas en tritordeum presenta las mismas características que trigo duro (**Figuras 152 y 163**). Las pérdidas en granos deportan un comportamiento más amortiguado, para las temperaturas ensayadas, es decir una mayor estabilidad para los pigmentos entre las mismas lo cual está en conformidad con los resultados expuestos hasta el momento. Las temperaturas -32 y 6°C condujeron también a mermas superiores en granos, 30 y 30.5% que en harinas, 7 y 13% respectivamente, lo que implica que dicho efecto se produce para los dos cereales. Así mismo la temperatura de 20°C también registró mayor descenso en grano (44%) que en harinas (32%).

Con respecto a pigmentos libres (**Figuras 157 y 167**) ambos perfiles se diferencian de forma más patente para el caso de *cis*-luteína, siendo el comportamiento a 37°C muy distante entre el material intacto y el molido. El paso de grano a harina no deporta una pauta muy consensuada a 20°C entre los pigmentos presentes. Así para *all-trans*-luteína las pérdidas se incrementaron, para *cis*-luteína permanecieron similares y para β -caroteno disminuyeron. Con respecto a este último, la temperatura de 50°C, al igual que en trigo duro, produce una desaparición más rápida siendo en harinas cuatro meses antes que en granos. Este dato está en consonancia con el cambio de matriz y con la vulnerabilidad de dicho carotenoide en las condiciones ensayadas. Así mismo, las respectivas pérdidas a 37



y 50°C mayores en harinas que en granos también para los demás pigmentos, *all-trans*-luteína y *cis*-luteína, se encuentran concordantes con dicha transición.

Como se ha descrito para trigo duro, la evolución de las fracciones esterificadas obedece al concurso de dos fenómenos opuestos, síntesis y degradación, estando ambos presentes tanto en granos como en harinas y siendo la actividad aciltransferasa de naturaleza enzimática distinta (**Figuras 157 y 167**). La comparación en tritordeum muestra una situación más próxima, de la evolución a lo largo del almacenamiento de estas fracciones, entre ambos estados de la matriz. Las harinas no presentan unos aumentos tan acusados, aunque fueron superiores a los que acontecían en granos, como se refleja en la evolución para la fracción de diésteres. Las fracciones monoesterificadas, debido a su situación intermedia en la ruta sintética de ésteres de luteína, presentan una pauta dominada por descensos que incrementan con la temperatura y coincide con los aumentos de la fracción de diésteres. Esta característica fue común para granos y harinas, aunque el balance entre los fenómenos anabólicos/catabólicos (pigmentos esterificados y degradados) fue dependiente de la temperatura impuesta. Al igual que en trigo duro, a 20°C se observaron pérdidas mayores en granos (31%) que harinas (18%), observándose lo contrario a 37°C (41% para granos y 78% para harinas). Se debe tener en cuenta que a 37°C la influencia de factores como el estrés oxidativo del medio (harinas) y la termodegradación debe de ser relevante. A 50°C el sumatorio de ambos factores genera la desaparición de la fracción monoesterificada en el octavo mes de almacenamiento en harinas, mientras que en granos se observa una retención del 14% al final del periodo de ensayo. La actividad sintética culmina con el grupo de diésteres los cuales manifiestan una diferencia de intensidad en la misma siendo superior, como se ha indicado, en harinas. El cambio ocasionado en el medio se visualiza nuevamente a 50°C trascurrido el almacenamiento produciéndose solo en granos una retención en pigmentos del 39%. No obstante, en ambas situaciones, se refleja la protección traducida en una mayor retención como consecuencia de la esterificación del pigmento, incrementándose dicha protección con el grado de esterificación.

La comparación más detallada para pigmentos esterificados, implica cambios en la estabilidad como se refleja en los perfiles de evolución a lo largo del almacenamiento (**Figuras 161 y 171**). Sin embargo, luteína monolinoleato sigue manifestándose tanto en granos como harinas como el monoéster más estable. El dato destacable son las pérdidas registradas a 37 y 50°C, siendo en harinas para los dos monoésteres superiores a las obtenidas en granos. Igualmente los aumentos registrados a 6 y 20°C en harinas para luteína monolinoleato contrastan con las pérdidas observadas en granos. El perfil de luteína monopalmitato también diferencia a ambos materiales, grano intacto y molido, aunque en



este caso se mantiene una pauta más conservadora al final del almacenamiento. El paso de grano a harina también proporciona aspectos a comentar a nivel de los distintos regioisómeros (**Figuras 162 y 172**). Para el caso de los regioisómeros con ácido linoleico, fueron las formas esterificadas en la posición 3' de luteína las que mostraron de nuevo mayor estabilidad frente a los correspondientes regioisómeros en la posición 3, lo que indica un nulo o reducido efecto del procesado por molienda. Con respecto a los regioisómeros del éster monopalmitato el análisis comparativo sí muestra en este caso mayores diferencias. En los granos las dos posiciones resultaban ser igualmente equivalentes no estableciéndose diferencias llamativas en las pérdidas registradas tras el almacenamiento. Sin embargo, para el caso de harinas, la pérdida de integridad celular se traduce en este caso en una mayor estabilidad para las posiciones 3' frente a las 3. El conjunto de diésteres (**Figuras 161 y 171**) guarda una cierta similitud, entre granos y harinas, manteniendo una tendencia más favorable conforme incrementa la temperatura hasta 37°C. En ambos casos, fueron los diésteres con ácido linoleico (luteína dilinoleato y luteína linoleatopalmitato) los más estables.

Los resultados expuestos con anterioridad pueden ser también visualizados en términos cinéticos. Estableciendo primero la comparación para los pigmentos libres (**Tablas 30 y 37**) éstos presentan constantes de velocidad a 37 y 50°C superiores en harinas que en granos, aproximadamente 3 y 2.5 veces respectivamente. *cis*-Luteína y β -caroteno suponen casos extremos debido a unas diferencias más acusadas para el primero, con respecto al resto de pigmentos, así como escasas diferencias para el segundo. Esto indica en conjunto que la degradación de los pigmentos libres cursó más rápidamente en harinas. Al igual que se ha comentado con anterioridad, los incrementos de ésteres que acontecen a cada temperatura, tanto en grano como en harina, queda reflejado en el efecto global de las pérdidas para las fracciones totales lo cual también se traduce a nivel cinético (**Tablas 31 y 38**). A 37°C los valores de k resultaron aproximadamente 1.5 veces superior en harinas, situación opuesta a 20°C. A 50°C la velocidad de la reacción de degradación cursa 2.5 veces más rápido en harinas que en granos. Estos datos son consecuentes con los niveles nulos registrados de forma generalizada entre todos los pigmentos presentes, incluidos los esterificados, a dicha temperatura finalizado el experimento en harinas. En granos ningún pigmento esterificado desapareció completamente a la finalización del periodo de almacenamiento. Los valores de $t_{1/2}$ y D para ambas situaciones, trasladables tanto a fracciones de pigmentos libres (**Tablas 30 y 37**), como totales (**Tablas 31 y 38**), son congruentes con lo expuesto en el presente apartado para los valores de k ya que se encuentran inversamente relacionados con éstos. Al igual que en trigos, cabe destacar los valores obtenidos para luteína y carotenoides totales a la temperatura de conservación de



20°C. El almacenamiento de harinas se caracterizó por presentar valores de vida media incrementados en 5 meses con respecto a granos tanto para el caso de luteína total como para el total de carotenoides presentes.

El análisis para pigmentos esterificados (**Tablas 32 y 39**), reveló que el cambio de grano a harina implica una mayor velocidad en harinas cursando la degradación más rápida. Estos resultados, generalizados para todas las temperaturas y pigmentos esterificados, son impuestos por la influencia del medio de reacción (efecto del procesado). La fracción de monoésteres a 37 y 50°C presentó valores de k de 3 y 4 veces superior en harinas que en granos. El análisis particular para regioisómeros permite realizar alguna consideración. Para el caso de luteína-3'-*O*-linoleato la velocidad de degradación a 50°C transcurrió nueve veces más rápida en harinas. Para luteína-3-*O*-linoleato la reacción cursa con una velocidad a 50°C de 4 veces superior en harinas. Con respecto a los regioisómeros con ácido palmítico, luteína-3'-*O*-palmitato presentó valores de k a 37 y 50°C de 2 y 4 veces superior en harinas, así como luteína-3-*O*-palmitato de 4 veces superior para ambas temperaturas. La fracción de diésteres total mostró una diferencia aún más acusada, que la de monoésteres, acelerándose la reacción en harinas 7 veces más a 50°C. Finalmente los datos obtenidos para la fracción de ésteres totales mostró un valor de k de 4.5 veces superior en el material molido.

En el campo de los cereales la evaluación de la estabilidad de carotenoides durante los distintos sistemas de procesado aplicados ha sido analizada por otros autores (Abdel-AAI *et al.*, 2010; Hidalgo *et al.*, 2010; Fratianni *et al.*, 2012). Estos trabajos, al igual que el descrito en la presente Tesis Doctoral, proporcionan una visión del impacto del procesamiento de dichos alimentos sobre la calidad nutricional de los mismos. Esto resulta realmente importante ya que los cereales se consumen generalmente modificados mediante dichos tratamientos. Sin embargo, aunque estos tratamientos repercuten de forma negativa en el contenido de estos fitoquímicos, como se ha expuesto, pueden tener al mismo tiempo efectos beneficiosos. La molienda provoca la alteración de la matriz alimentaria mediante la rotura de las paredes celulares y membranas, facilitando la liberación y solubilización de los nutrientes que se deriva en un incremento en la biodisponibilidad para el consumidor. Paralelo a esto, el aumento del carácter lipofílico que confiere la esterificación al carotenoide presenta ventajas también en este sentido. Uno de las fases que comprende el proceso de absorción de carotenoides, debido a su naturaleza lipofílica, es el paso a micelas mixtas o micelarización para ingresar en las células de la mucosa intestinal (Erdman *et al.*, 1993). Existen bastantes evidencias, observadas en modelos de digestión *in vitro*, de una correlación positiva entre aumento de grasas y porcentajes de carotenoides en las micelas (Garrett *et al.*, 1999; Granado-Lorencio *et al.*,



2007; Hornero-Méndez y Mínguez-Mosquera, 2007). La mayoría de estos trabajos se han realizado con frutos y vegetales siendo escasos los que se realizan con cereales (Kean *et al.*, 2008). En un trabajo realizado por Werner y Böhm (2011), los autores advierten sin embargo que los productos de pasta parecen ser una óptima fuente de luteína, mostrando ésta un buen grado de bioaccesibilidad en pruebas similares de digestiones *in vitro*. Esto unido al consumo generalizado, convierte a los cereales en alimentos muy interesantes como fuente de carotenoides en la dieta.

Los estudios de evolución y estabilidad del contenido carotenoide durante el almacenamiento de granos y harinas que han sido descritos son determinantes e imprescindibles para desarrollar cereales con un mayor contenido y preservación de estos fitonutrientes, como es el caso de tritordeum (biofortificación), o examinar la efectividad en este sentido de productos fortificados. La posible fortificación de harinas de cereales con enzimas tipo lipasas podría ser una estrategia para conseguir cereales con un mayor porcentaje de pigmentos esterificados. No obstante, dichas enzimas podrían encontrarse también catalizando la reacción opuesta. La rancidez hidrolítica es junto con la oxidativa los procesos degradativos de lípidos más importantes que acontecen durante el almacenamiento de harinas integrales (Galliard, 1986; Doblado-Maldonado *et al.*, 2012). Por lo que la adición de lipasas debería hacerse teniendo en cuenta ambas reacciones, síntesis e hidrólisis, e intentar favoreciendo la primera frente a la segunda. En cualquier caso, el aumento en pigmentos esterificados se traduce, en definitiva, en una mayor capacidad de retención y velocidades de degradación más lentas para el total de carotenoides presentes, bajo determinadas condiciones de almacenamiento, bien del cereal o del producto derivado.

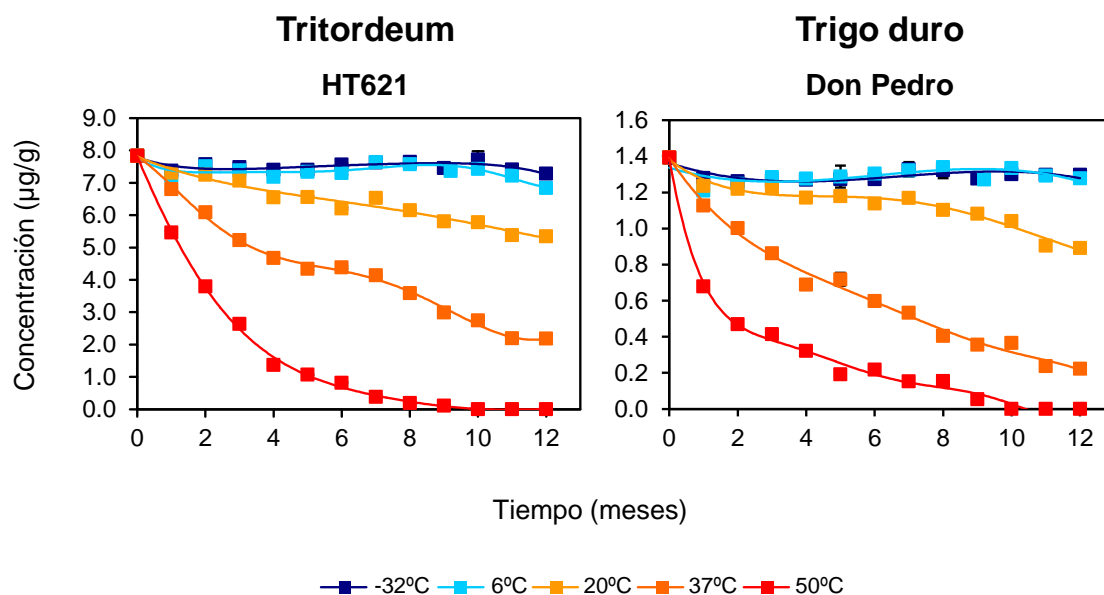
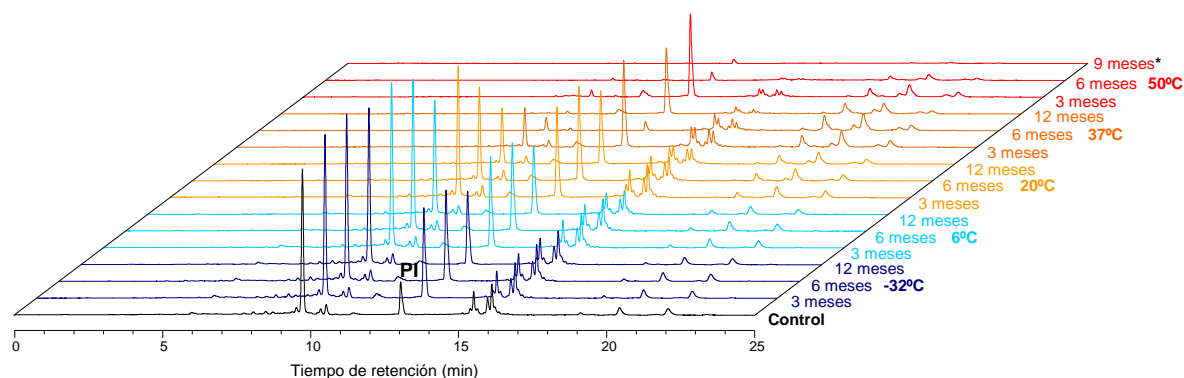


Figura 163. Evolución del contenido carotenoide total (µg/g) presente en harinas integrales de tritordeum (HT621) y trigo duro (Don Pedro) durante el almacenamiento prolongado (12 meses) a -32, 6, 20, 37 y 50°C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de tres análisis (n=3).

Tritordeum (HT621)



Trigo duro (Don Pedro)

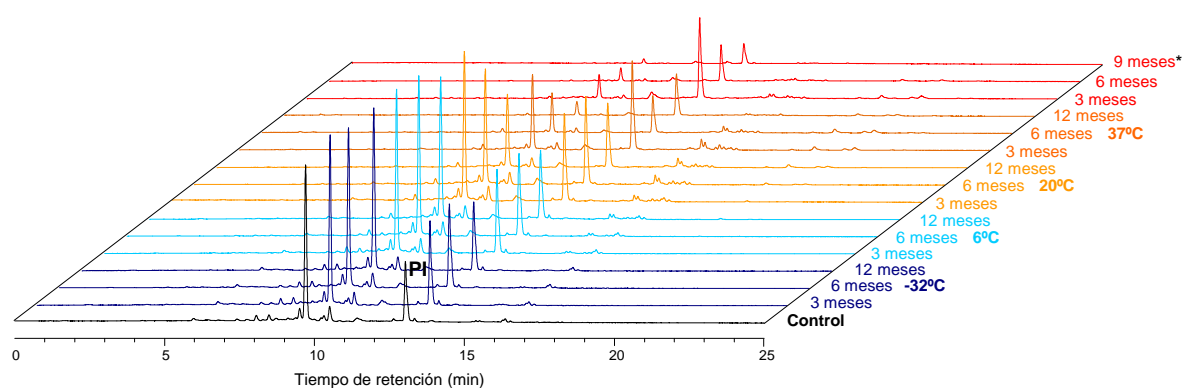


Figura 164. Evolución del perfil cromatográfico de pigmentos carotenoides presentes en harinas integrales de tritordeum (HT621) y trigo duro (Don Pedro) durante el almacenamiento prolongado (12 meses) a -32, 6, 20, 37 y 50°C. PI: patrón interno. *Para las muestras mantenidas a 50°C el contenido carotenoide alcanzó niveles no cuantificables a partir del décimo mes.

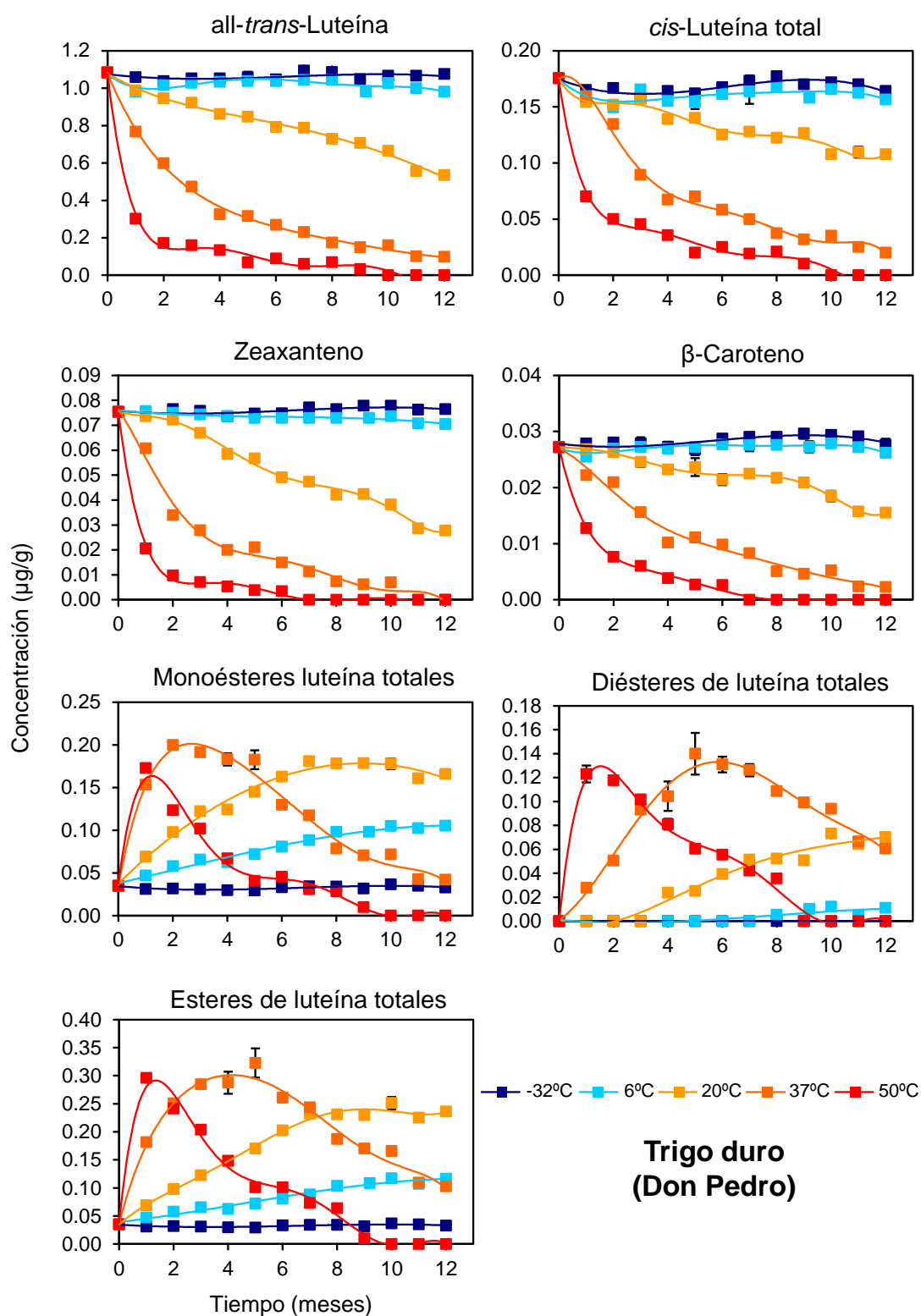


Figura 165. Evolución del contenido (µg/g) en carotenoides individuales (*all-trans*-luteína, *cis*-luteína zeaxanteno y β-caroteno) y fracciones esterificadas de luteína (monoésteres, diésteres y ésteres totales) presentes en harinas integrales de trigo duro (Don Pedro) durante el almacenamiento prolongado (12 meses) a -32, 6, 20, 37 y 50°C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de tres análisis (n=3).

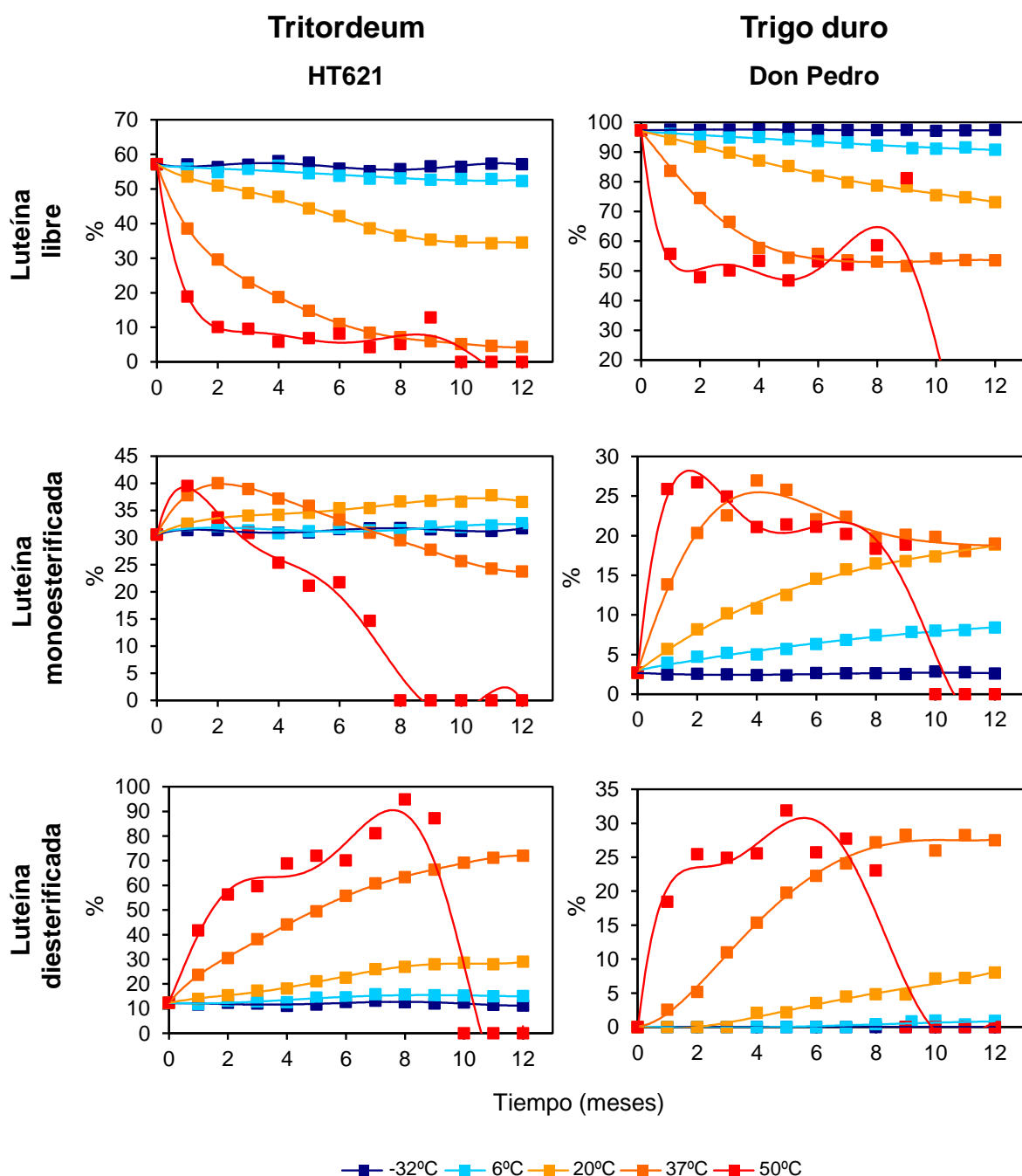
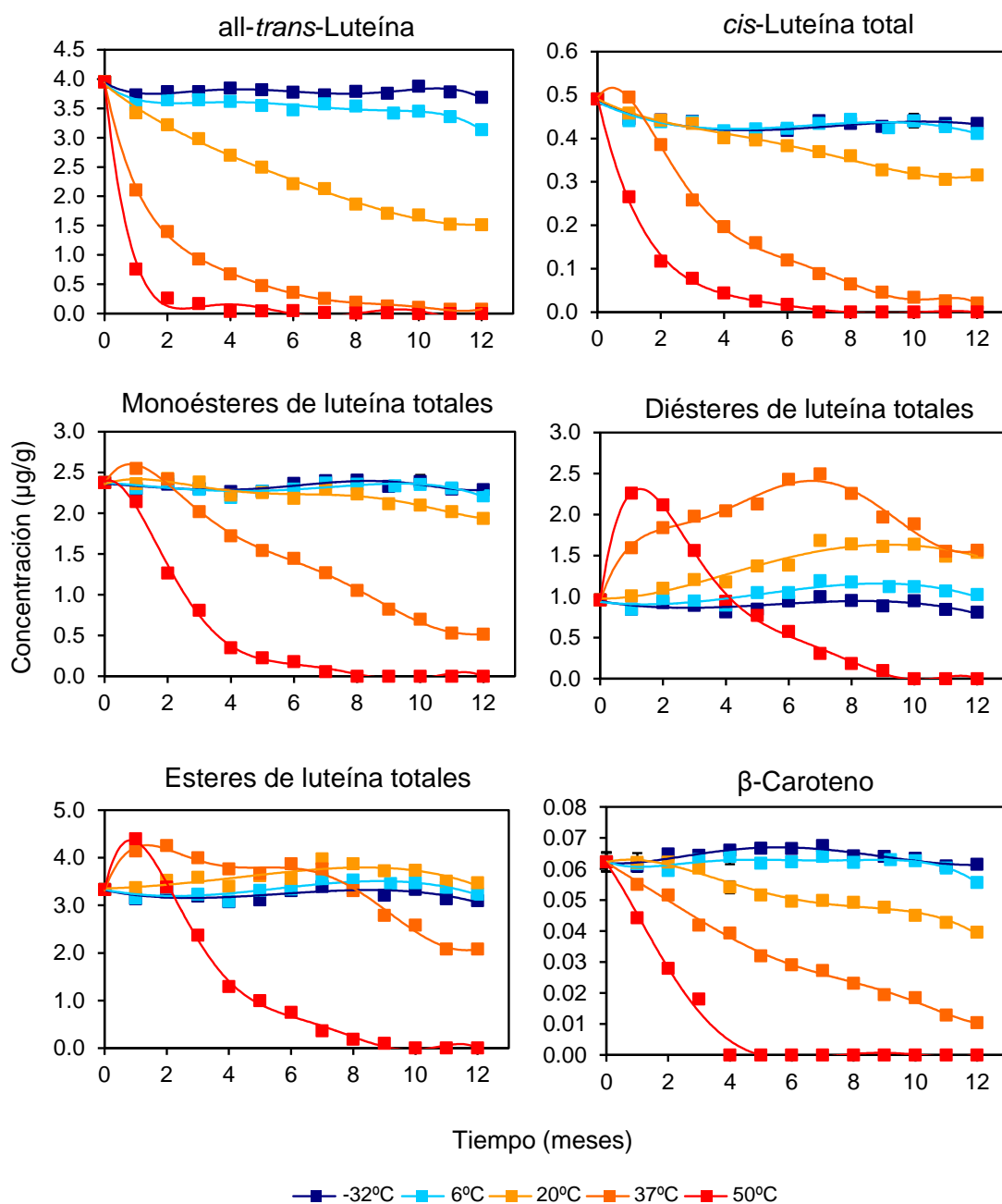


Figura 166. Efecto de la temperatura (-32, 6, 20 37 y 50°C) sobre el grado de esterificación de luteína durante el almacenamiento prolongado (12 meses) de harinas integrales de tritordeum (HT621) y trigo duro (Don Pedro). Para cada especie, los datos expresan la contribución porcentual de cada fracción (libre, monoesterificada y diesterificada).



Tritordeum (HT621)

Figura 167. Evolución del contenido (µg/g) en carotenoides individuales (*all-trans*-luteína, *cis*-luteína y β-caroteno) y fracciones esterificadas de luteína (monoésteres, diésteres y ésteres totales) presentes en harinas integrales de tritordeum (HT621) durante el almacenamiento prolongado (12 meses) a -32, 6, 20, 37 y 50°C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de tres análisis (n=3).

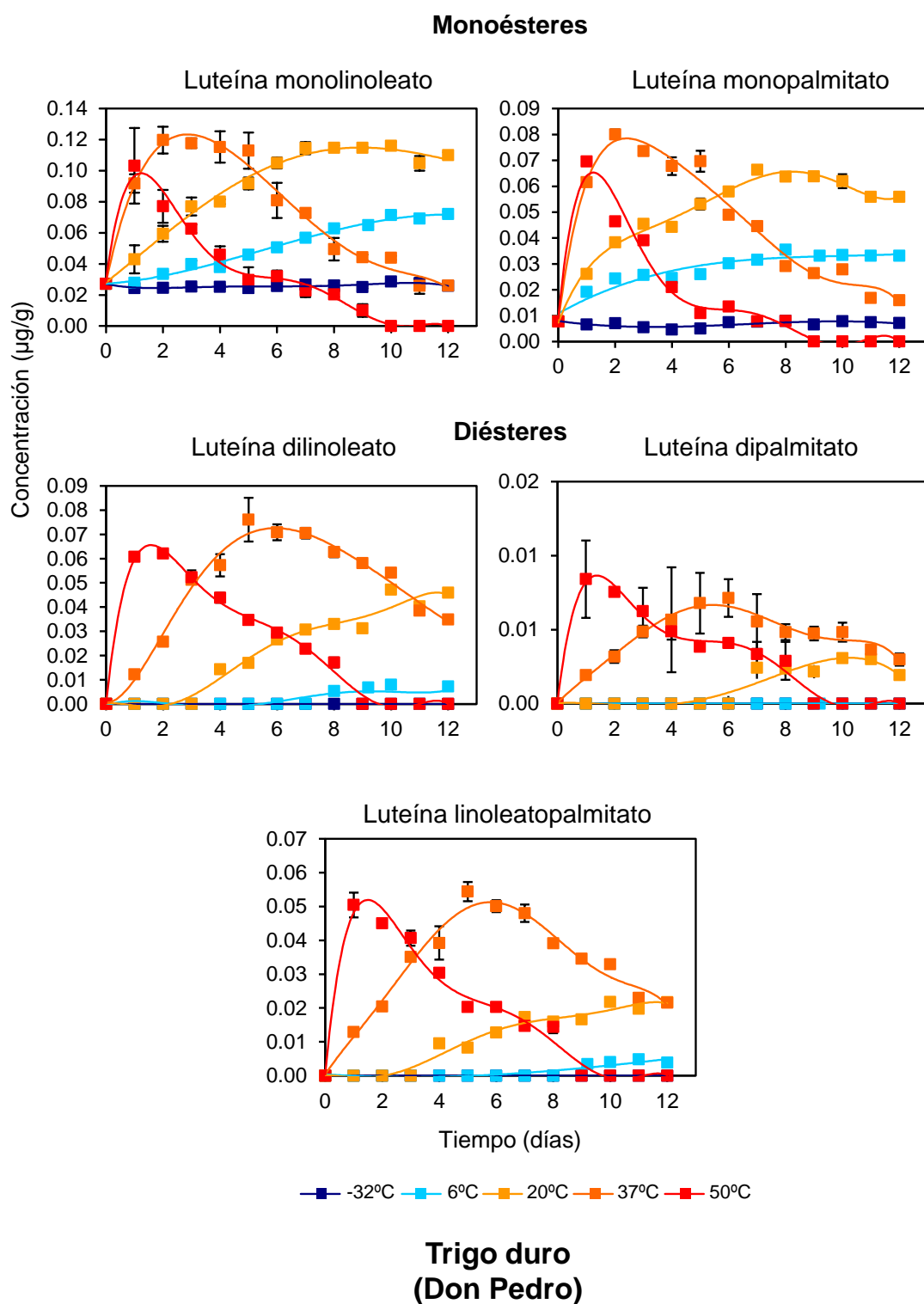


Figura 168. Evolución individual del contenido ($\mu\text{g/g}$) en monoésteres y diésteres de luteína presentes presentes en harinas integrales de trigo duro (Don Pedro) durante el almacenamiento prolongado (12 meses) a -32 , 6 , 20 , 37 y 50°C . Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de tres análisis ($n=3$).

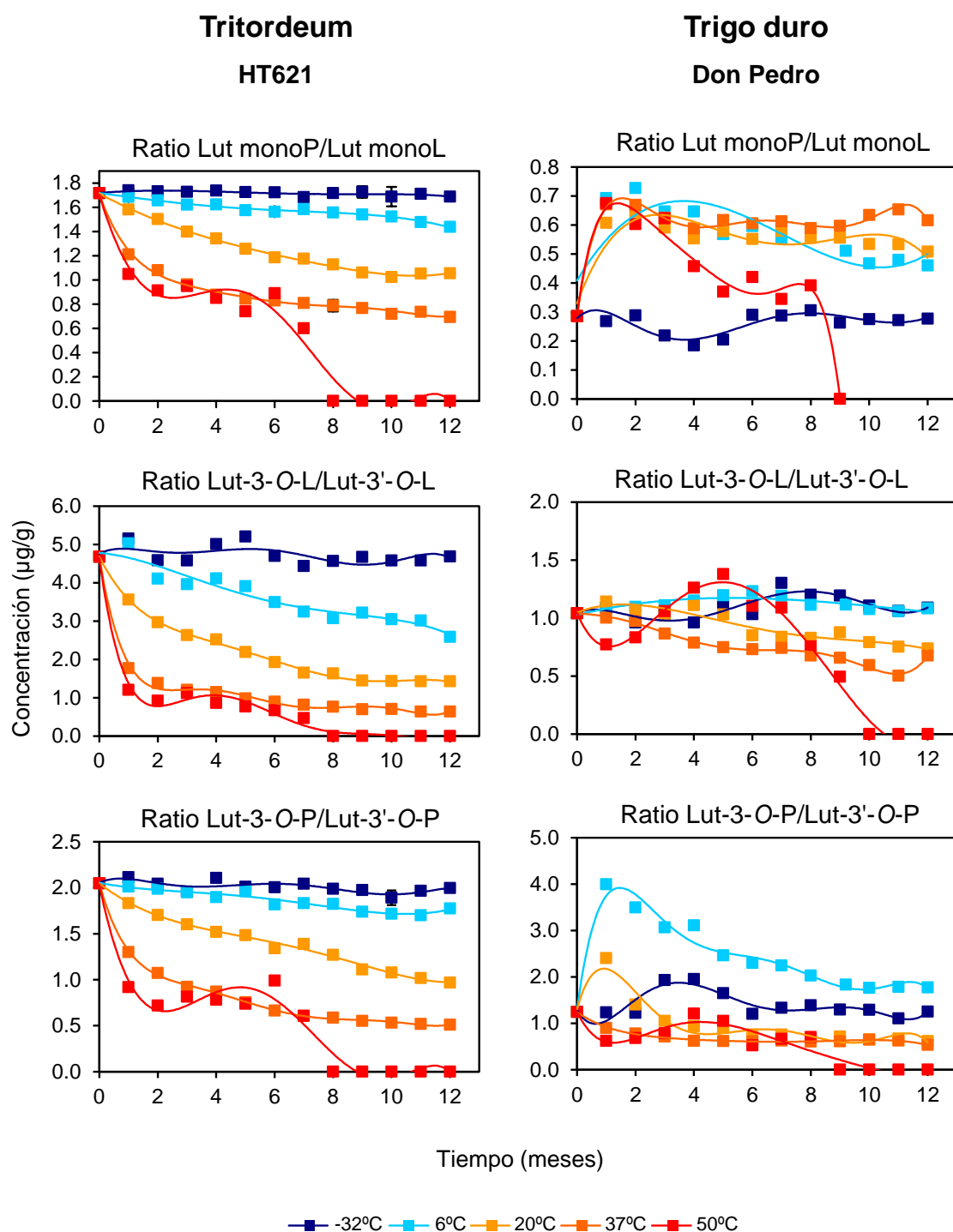


Figura 169. Cambios en los ratios de las fracciones de luteína monesterificada y los correspondientes regioisómeros presentes en harinas integrales de tritordeum (HT621) y trigo duro (Don Pedro) durante el almacenamiento prolongado (12 meses) a -32, 6, 20, 37 y 50°C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de tres análisis (n=3). Lut monoP (Luteína monopalmitato), Lut monoL (Luteína monolinoleato), Lut-3-O-L (Luteína-3-O-linoleato), Lut-3'-O-L (Luteína-3'-O-linoleato), Lut-3-O-P (Luteína-3-O-palmitato), Lut-3'-O-P (Luteína-3'-O-palmitato).

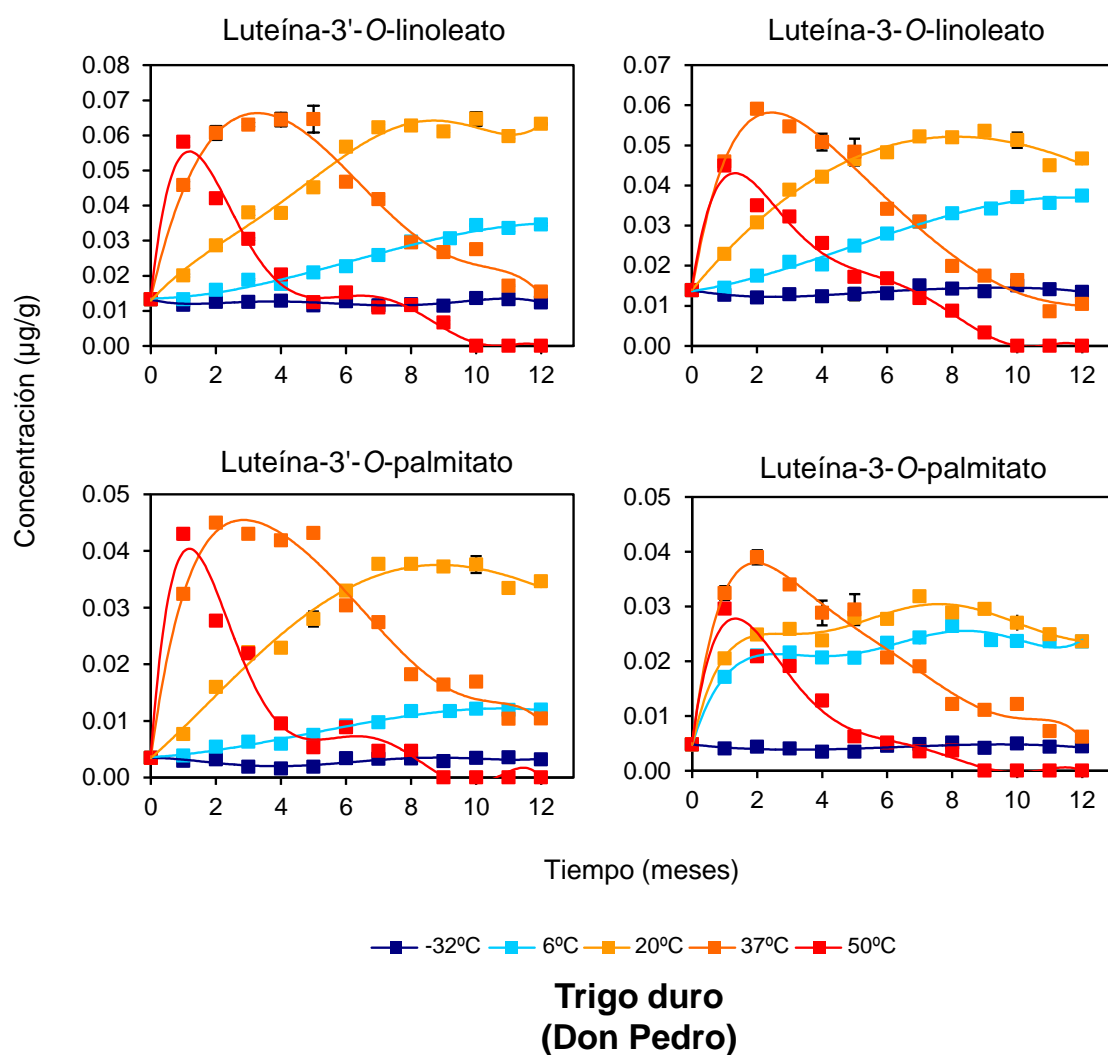
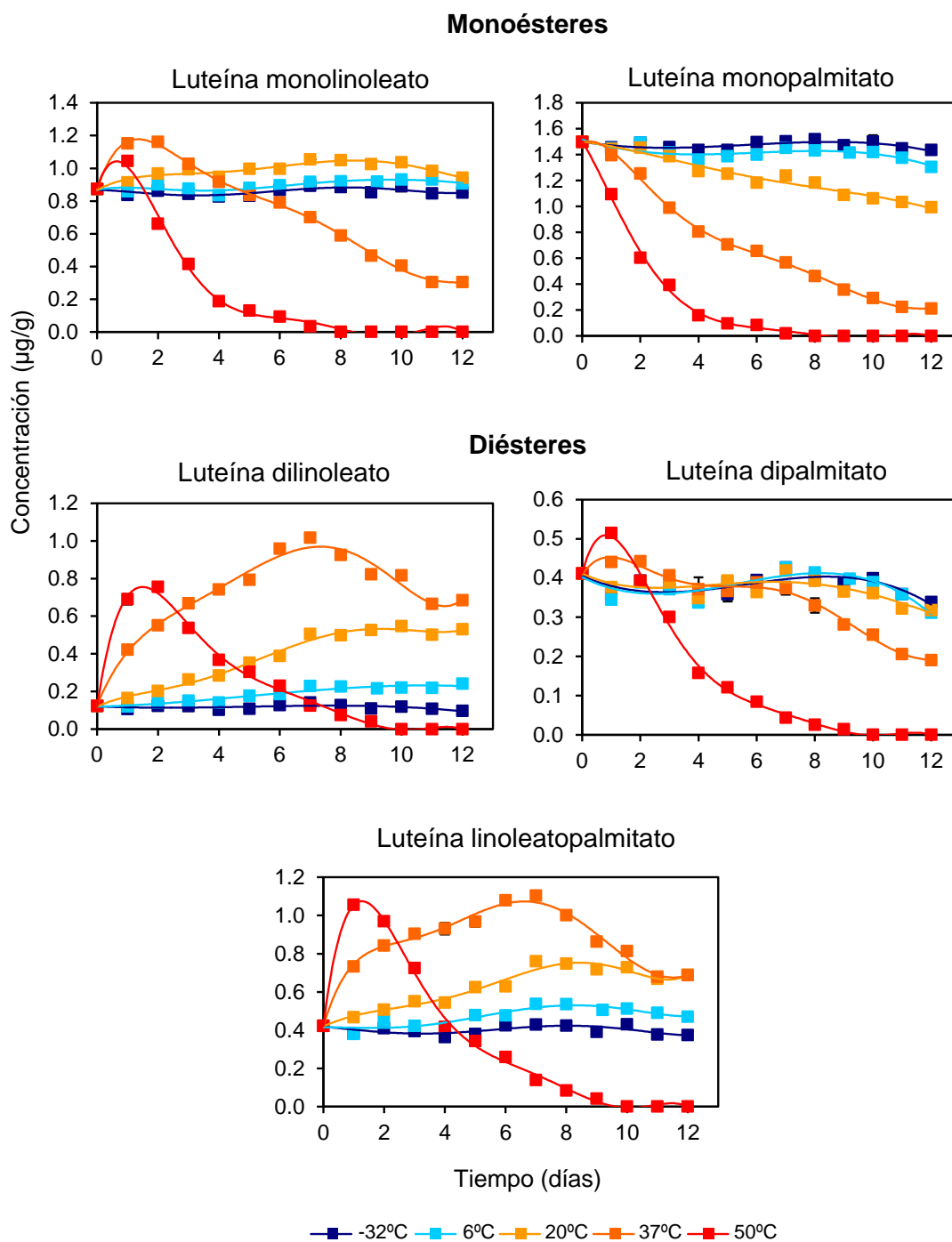


Figura 170. Cambios en el contenido de regiosómeros de luteína monolinoleato y luteína monopalmitato presentes en harinas integrales de trigo duro (Don Pedro) durante el almacenamiento prolongado (12 meses) a -32, 6, 20, 37 y 50°C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de tres análisis (n=3).



Tritordeum (HT621)

Figura 171. Evolución individual del contenido ($\mu\text{g/g}$) en monoésteres y diésteres de luteína presentes presentes en harinas integrales de tritordeum (HT621) durante el almacenamiento prolongado (12 meses) a -32 , 6 , 20 , 37 y 50°C . Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de tres análisis ($n=3$).

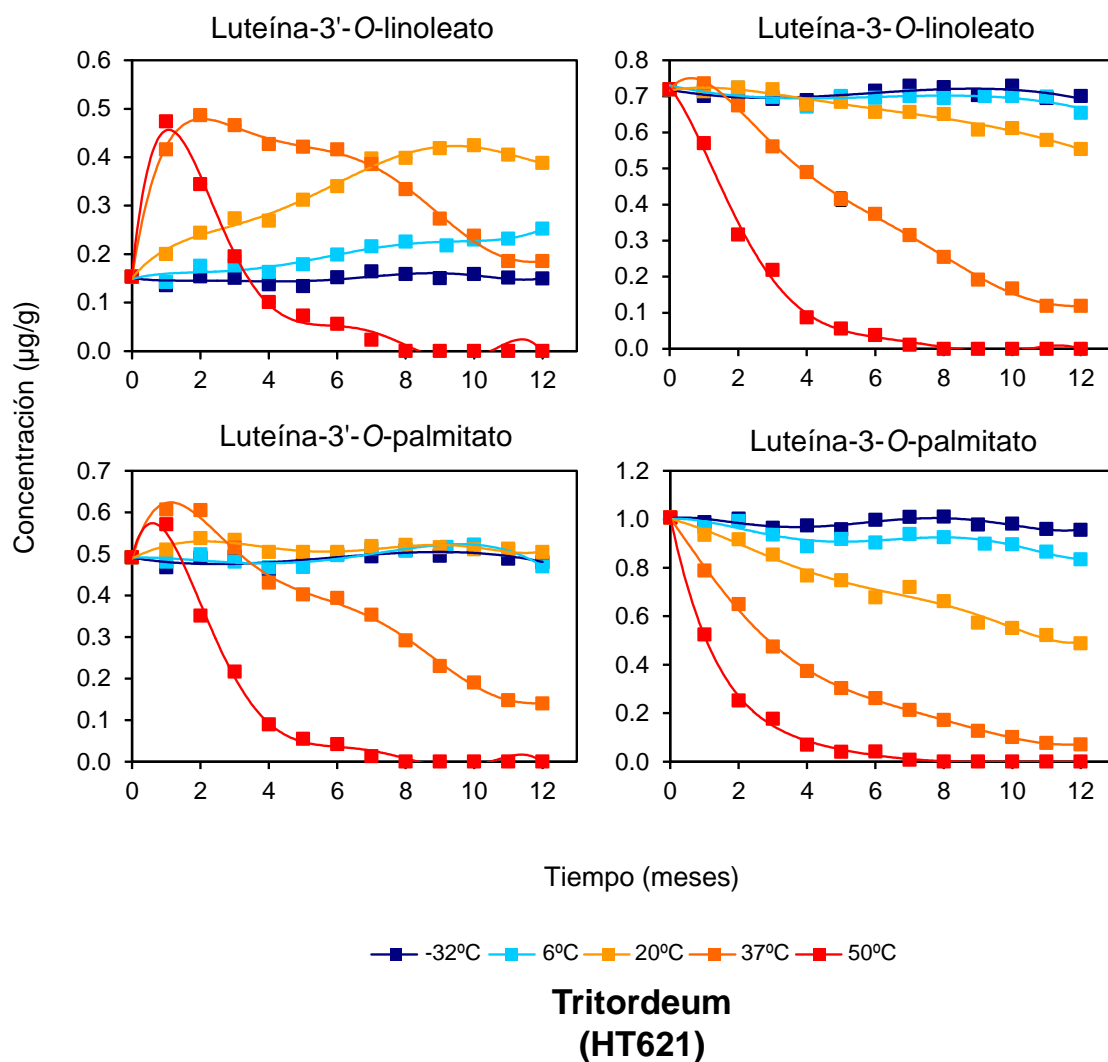


Figura 172. Cambios en el contenido de regiosómeros de luteína monolinoleato y luteína monopalmitato presentes en harinas integrales de tritordeum (HT621) durante el almacenamiento prolongado (12 meses) a -32, 6, 20, 37 y 50°C. Los valores representados corresponden a la media y el error estándar de tres análisis (n=3).



Tabla 33. Composición cualitativa y cuantitativa ($\mu\text{g/g}$)* de pigmentos carotenoides presentes en harinas de tritordeum y trigo duro sometidas a almacenamiento prolongado en condiciones de temperatura controlada.

Pigmento	Tritordeum (HT621)	Trigo (Don Pedro)
<i>all-trans</i> -Zeaxanteno	-	0.08 ± 0.00
<i>all-trans</i> -Luteína	3.95 ± 0.04	1.08 ± 0.02
9- <i>cis</i> -Luteína	0.19 ± 0.01	0.06 ± 0.00
13- <i>cis</i> -Luteína	0.23 ± 0.01	0.12 ± 0.00
Luteína monolinoleato	0.87 ± 0.00	0.03 ± 0.00
Luteína-3'- <i>O</i> -monolinoleato	0.15 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Luteína-3- <i>O</i> -monolinoleato	0.72 ± 0.01	0.01 ± 0.00
Luteína monopalmitato	1.50 ± 0.01	0.01 ± 0.00
Luteína-3'- <i>O</i> -monopalmitato	0.49 ± 0.01	0.00 ± 0.00
Luteína-3- <i>O</i> -monopalmitato	1.01 ± 0.02	0.00 ± 0.00
Luteína dilinoleato	0.12 ± 0.00	-
Luteína linoleatopalmitato	0.42 ± 0.01	-
Luteína dipalmitato	0.41 ± 0.01	-
<i>all-trans</i> - β -Caroteno	0.06 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Luteína total	7.77 ± 0.07	1.29 ± 0.02
Monoésteres totales	2.37 ± 0.01	0.04 ± 0.00
Diésteres totales	0.96 ± 0.01	-
Esteres totales	3.33 ± 0.02	0.04 ± 0.00
Carotenoides totales	7.83 ± 0.07	1.39 ± 0.03

*La tabla representa los valores medios y error estándar de la media para cinco replicados ($n=5$).



Tabla 34. Resumen de los fenómenos sintéticos y degradativos para las fracciones de monoésteres y sus respectivos regioisómeros presentes en harinas de trigo duro sometidas a almacenamiento prolongado en condiciones de temperatura controlada.

Tª (°C)*	Luteína monolinoleato	Luteína-3'-O- linoleato	Luteína-3-O- linoleato	Luteína monopalmitato	Luteína-3'-O- palmitato	Luteína-3-O- palmitato
-32°C	D [§] : 5 %	D: 7 %	D: 3 %	D: 8 %	D: 8 %	D: 8 %
6°C	S [#] :165 %	S:159 %	S:170 %	S: 327 %	S: 246 %	S: 392 %
20°C	S: 304.1 %	S: 375 %	S: 236 %	S: 619 %	S: 900 %	S: 393 %
37°C	S: 0-2 meses 340 %	S: 0-5 meses 385 %	S: 0-2 meses 325 %	S: 0-2 meses 930 %	S: 0-2 meses 1200 %	S: 0-2 meses 713 %
	D: 3-12 meses 78 %	D: 6-12 meses 76 %	D: 3-12 meses 82 %	D: 3-12 meses 80%	D: 3-12 meses 77 %	D: 3-12 meses 84 %
50°C	S: 0-1 meses 279 %	S: 0-1 meses 337 %	S: 0-1 meses 224 %	S: 0-1 meses 797 %	S: 0-1 meses 1143 %	S: 0-1 meses 517 %
	D: 2-12 meses 100 %	D: 2-12 meses 100 %	D: 2-12 meses 100 %	D: 2-12 meses 100 %	D: 2-12 meses 100 %	D: 2-12 meses 100 %

*Para las temperaturas -32, 6 y 20°C solo reflejan una tendencia a lo largo del almacenamiento por lo que en este caso los porcentajes son referidos al final del periodo.

§D: degradación.

#S: síntesis



Tabla 35. Ajuste a un modelo cinético de orden cero ($C-C_0=-kt$) de la evolución del contenido pigmentos libres (no esterificados) presentes en harinas de tritordeum y trigo duro sometidas a almacenamiento prolongado en condiciones de temperatura controlada.

Pigmento	Tª (°C)	Tritordeum		Trigo duro	
		k (mes ⁻¹)	R ²	k (mes ⁻¹)	R ²
all- <i>trans</i> -Zeaxanteno	-32	-	-	0.0001	0.2736
	6	-	-	0.0003	0.7932
	20	-	-	0.0039	0.9773
	37	-	-	0.0079	0.5358
	50	-	-	0.0089	-1.0190
all- <i>trans</i> -Luteína	-32	0.0208	-0.7380	0.0021	-0.6620
	6	0.0615	0.4640	0.0082	-0.3760
	20	0.2397	0.8988	0.0454	0.9660
	37	0.4398	-0.0790	0.1052	0.4671
	50	0.4697	-1.3910	0.1241	-0.9030
all- <i>trans</i> -β-Caroteno	-32	0.0002	-0.3010	0.0002	0.3277
	6	0.0001	0.0927	0.0001	-0.0160
	20	0.0018	0.9437	0.0008	0.9218
	37	0.0047	0.9456	0.0022	0.8200
	50	0.0072	0.1598	0.0028	-0.2200
<i>cis</i> -Luteína total	-32	0.0071	-1.2120	0.0008	-0.7600
	6	0.0075	-0.8900	0.0017	-1.2150
	20	0.0169	0.9519	0.0064	0.8486
	37	0.0485	0.8376	0.0157	0.7774
	50	0.0571	-0.2890	0.0194	-0.2930
Luteína libre total	-32	0.0279	-1.0450	0.0029	-0.8000
	6	0.0690	0.3715	0.0099	-0.6060
	20	0.2566	0.9045	0.0518	0.9623
	37	0.4883	0.0961	0.1209	0.5267
	50	0.5268	-1.2660	0.1435	-0.8170
Carotenoides libres total	-32	0.0277	-1.0110	0.0028	-0.7610
	6	0.0691	0.3752	0.0099	-0.6060
	20	0.2584	0.9065	0.0526	0.9632
	37	0.4930	0.1118	0.1231	0.5343
	50	0.5340	-1.2420	0.1463	-0.8050



Tabla 36. Ajuste a un modelo cinético de orden cero ($C-C_0=-kt$) de la evolución del contenido de pigmentos totales (incluyendo xantofilas esterificadas) presentes en harinas de tritordeum y trigo duro sometidas a almacenamiento prolongado en condiciones de temperatura controlada.

Pigmento	Tª (°C)	Tritordeum		Trigo duro	
		k (mes ⁻¹)	R ²	k (mes ⁻¹)	R ²
Luteína total	-32	0.041	-0.7200	0.003	0.8380
	6	0.063	-0.2220	0.003	0.4750
	20	0.219	0.9258	0.034	0.9141
	37	0.530	0.8840	0.108	0.8668
	50	0.868	0.3876	0.143	0.0690
Carotenoides totales	-32	0.040	-0.7010	0.003	-0.7980
	6	0.063	-0.2150	0.003	-0.4660
	20	0.221	0.9273	0.035	0.9153
	37	0.534	0.8848	0.110	0.8660
	50	0.876	0.3858	0.146	-0.0720

Tabla 37. Ajuste a un modelo cinético de primer orden ($\ln(C/C_0)=-kt$) de la evolución del contenido pigmentos libres (no esterificados) presentes en harinas de tritordeum y trigo duro sometidas a almacenamiento prolongado en condiciones de temperatura controlada.

Pigmento	Tª (°C)	Tritordeum				Trigo duro			
		k (mes ⁻¹)	R ²	t _{1/2} (meses)	D (meses)	k (mes ⁻¹)	R ²	t _{1/2} (meses)	D (meses)
all- <i>trans</i> - Zeaxanteno	-32	-	-	-	-	0.002	0.2710	433	1439
	6	-	-	-	-	0.005	0.7899	151	500
	20	-	-	-	-	0.074	0.9384	9	31
	37	-	-	-	-	0.271	0.9583	3	9
	50	-	-	-	-	0.622	0.7473	1	4
all- <i>trans</i> - Luteína	-32	0.005	0.7140	128	426	0.002	-0.6640	347	1151
	6	0.017	0.5202	41	137	0.008	-0.3480	89	295
	20	0.088	0.9820	8	26	0.054	0.9582	13	43
	37	0.370	0.9647	2	6	0.216	0.9511	3	11
	50	0.774	0.7700	1	3	0.427	0.6312	2	5
all- <i>trans</i> -β- Caroteno	-32	0.003	0.2980	224	743	0.006	0.3228	114	377
	6	0.002	0.0969	347	1151	0.0001	-0.0190	13860	46040
	20	0.033	0.9386	21	69	0.039	0.8752	18	59
	37	0.133	0.9745	5	17	0.196	0.9573	4	12
	50	0.404	0.9947	2	6	0.454	0.9081	2	5
<i>cis</i> -Luteína total	-32	0.015	1.1580	45	149	0.005	-0.7500	147	490
	6	0.016	0.8220	43	141	0.011	-1.1720	66	219
	20	0.041	0.9730	17	56	0.044	0.9021	16	52
	37	0.257	0.9823	3	9	0.181	0.9746	4	13
	50	0.587	0.9873	1	4	0.331	0.7468	2	7
Luteína libre total	-32	0.007	1.0170	107	354	0.002	-0.8020	301	1001
	6	0.017	0.4380	42	138	0.008	-0.5730	85	281
	20	0.082	0.9811	8	28	0.052	0.9650	13	44
	37	0.351	0.9788	2	7	0.211	0.9580	3	11
	50	0.760	0.8791	1	3	0.409	0.6470	2	6
Carotenoides libres totales	-32	0.006	0.9830	110	365	0.009	-1.9830	77	256
	6	0.017	0.4402	42	140	0.015	-1.1440	47	155
	20	0.081	0.9816	9	28	0.059	0.9456	12	39
	37	0.342	0.9772	2	7	0.217	0.9483	3	11
	50	0.761	0.8867	1	3	0.419	0.6436	2	5



Tabla 38. Ajuste a un modelo cinético de primer orden ($\ln(C/C_0)=-kt$) de la evolución del contenido de pigmentos totales (incluyendo xantofilas esterificadas) presentes en harinas de tritordeum y trigo duro sometidas a almacenamiento prolongado en condiciones de temperatura controlada.

Pigmento	Tª (°C)	Tritordeum				Trigo duro			
		k (mes ⁻¹)	R ²	t _{1/2} (meses)	D (meses)	k (mes ⁻¹)	R ²	t _{1/2} (meses)	D (meses)
Luteína total	-32	0.005	-0.6980	128	426	0.002	-0.8400	289	959
	6	0.009	-0.1840	82	271	0.002	-0.4400	365	1212
	20	0.033	0.9479	21	71	0.027	0.8572	26	86
	37	0.107	0.9735	6	22	0.142	0.9802	5	16
	50	0.436	0.9784	2	5	0.326	0.8993	2	7
Carotenoides totales	-32	0.005	-0.6800	131	434	0.009	-1.9950	77	256
	6	0.008	-0.1780	83	274	0.009	-1.5370	82	271
	20	0.033	0.9489	21	71	0.034	0.8414	21	68
	37	0.107	0.9739	6	21	0.150	0.9807	5	15
	50	0.437	0.9786	2	5	0.337	0.8917	2	7

Tabla 39. Constantes de velocidad y coeficientes de correlación para un modelo cinético de primer orden en pigmentos esterificados en harinas de tritordeum y trigo duro sometidos a almacenamiento prolongado.

Pigmento	Tª (°C)	Tritordeum		Trigo duro	
		k (mes ⁻¹)	R ²	k (mes ⁻¹)	R ²
Luteína monolinoleato	20	-	-	-	-
	37	0.113	0.8748	0.210	0.9568
	50	0.388	0.9000	0.262	0.9609
Luteína-3'- <i>O</i> -linoleato	20	-	-	-	-
	37	0.103	0.9143	0.184	0.9393
	50	0.487	0.9829	0.230	0.8988
Luteína-3- <i>O</i> -linoleato	20	0.022	0.9191	-	-
	37	0.140	0.9404	0.200	0.9473
	50	0.526	0.9597	0.284	0.9110
Luteína monopalmitato	20	0.034	0.9657	-	-
	37	0.158	0.9803	0.204	0.9473
	50	0.544	0.9636	0.332	0.9351
Luteína-3'- <i>O</i> -palmitato	20	-	-	-	-
	37	0.147	0.9669	0.201	0.9472
	50	0.606	0.9795	0.329	0.8730
Luteína-3- <i>O</i> -palmitato	20	0.059	0.9783	-	-
	37	0.228	0.9963	0.186	0.9618
	50	0.632	0.9646	0.336	0.9577
Monoésteres totales	20	0.013	0.7814	-	-
	37	0.114	0.9124	0.208	0.9541
	50	0.471	0.9501	0.310	0.9379
Luteína dilinoleato	20	-	-	-	-
	37	0.085	0.9236	0.111	0.8995
	50	0.370	0.9737	0.188	0.9649
Luteína linoleatopalmitato	20	-	-	-	-
	37	0.103	0.9577	0.139	0.9547
	50	0.400	0.9662	0.201	0.9625
Luteína dipalmitato	20	-	-	-	-
	37	0.066	0.8301	0.090	0.7785
	50	0.451	0.9846	0.156	0.9637
Diésteres totales	20	-	-	-	-
	37	0.088	0.9325	0.122	0.9327
	50	0.395	0.9660	0.190	0.9810
Esteres totales	20	-	-	-	-
	37	-	-	0.162	0.9647
	50	0.472	0.9767	0.333	0.8093



6. CONCLUSIONES.

1. La caracterización de la composición carotenoide en trigo duro y tritordeum ha permitido por vez primera realizar un estudio detallado y comparativo de líneas avanzadas de tritordeum y variedades comerciales de trigo duro. Aunque en ambos casos el pigmento mayoritario es luteína existe una clara diferenciación en base al contenido carotenoide, el cual es mayor en tritordeum y al perfil de carotenoides individuales. Tritordeum se caracteriza por la presencia de ésteres de luteína con ácidos grasos (monoésteres y diésteres), así como por la ausencia de zeaxanteno y α -caroteno, los cuales si singularizan a trigo duro. La presencia de ésteres de luteína no es exclusiva de tritordeum pudiéndose encontrar en granos de trigo duro bajo determinadas condiciones de almacenamiento.
2. La asimetría de la molécula de luteína, con un anillo β - y un anillo ϵ - en cada extremo de la molécula, convierte en no equivalentes a los grupos hidroxilo de las posiciones 3 y 3', por lo que existe la posibilidad de presencia de regioisómeros dentro de las fracciones de monoésteres y diésteres. En base a esto, la naturaleza de la esterificación de luteína en tritordeum ha sido identificada posibilitando la asignación estructural de los correspondientes regioisómeros, siendo la primera vez que se realiza en un cereal. La combinación de técnicas cromatográficas y de espectroscopía de masas (LC/MS) y el estudio de la fragmentación molecular ha resultado ser crucial para tal fin. La fracción de monoésteres la conforman los regioisómeros luteína-3'-*O*-linoleato, luteína-3-*O*-linoleato, luteína-3'-*O*-palmitato y luteína-3-*O*-palmitato, mientras que la fracción de diésteres está integrada por 2 homoésteres, luteína dilinoleato y luteína dipalmitato, y por los dos regioisómeros de un heretodiéster, luteína-3'-*O*-linoleato-3-*O*-palmitato y luteína-3'-*O*-palmitato-3-*O*-linoleato.
3. El estudio comparado de las distintas fracciones de luteína monoesterificadas permite afirmar que su formación, tanto por reacción química como mediada por enzimas, se realiza de forma preferencial sobre el grupo hidroxilo de la posición 3 del anillo β -. Los ésteres con ácido palmítico (monoésteres y diésteres) fueron siempre los más abundantes, sugiriendo una actividad acetiltransferasa preferencial sobre este ácido.
4. Los ácidos grasos que participan en la esterificación, palmítico y linoléico son los mayoritarios, junto con oléico, del perfil de ácidos grasos totales. Esto es válido tanto para tritordeum como para trigo duro, por lo que se puede afirmar que la formación de

ésteres de xantofilas es independiente de la composición del *pool* de lípidos totales. Los resultados obtenidos indican que el proceso de esterificación de xantofilas es altamente selectivo y apunta a que las moléculas implicadas en la donación/trasferencia de grupos acilo pueden ser monogalactosildiacilglicerol (MGDG) y digalactosildiacilglicerol (DGDG) debido a su abundancia en el endospermo de trigo y a su composición en ácidos grasos. La sencillez del perfil de esterificación que ha sido caracterizado en tritordeum podría convertir al anfiploide en un modelo vegetal ideal para la caracterización molecular y genética del proceso de esterificación de xantofilas en vegetales.

5. Por primera vez se ha caracterizado el perfil carotenoide de los granos de *Hordeum chilense*. La abundancia de ésteres de luteína en el perfil, y la concordancia del mismo con el de tritordeum, avala, sin género de dudas, que el origen de la esterificación de luteína del anfiploide deriva del fondo genético de este parental.
6. El análisis organográfico del grano de cereal, endospermo y embrión, confirmó la presencia en ambas zonas de ésteres de luteína en tritordeum. Éstos se concentraron mayoritariamente en el endospermo lo que evidencia una actividad esterificante preferencial en el tejido de reserva del grano. La determinación del perfil de ácidos grasos indicó que la presencia de ésteres de luteína viene limitada por la existencia de enzimas específicas (denominadas XAT: Xanthophyll acetyltransferase) y no por la disponibilidad de los sustratos.
7. Durante el desarrollo de los granos de cereal acontecen una serie de cambios metabólicos y bioquímicos, incluyendo la biosíntesis y acumulación de pigmentos cloroplásticos (clorofilas y carotenoides). La detección de carotenoides desde el inicio del desarrollo prueba un papel relevante de éstos en la morfogénesis de la semilla, siendo sus tasas de síntesis y reposición constantes. Trigo duro presentó un contenido mayor de pigmentos cloroplásticos, a lo largo del desarrollo, situación que se invierte en el grano maduro. Esto indica una mayor capacidad de retención y almacenamiento de pigmentos en tritordeum durante el periodo final de maduración, favorecido por el proceso de esterificación activado en este periodo postdesarrollo.
8. La evolución biosintética de carotenoides fue distinta en granos de trigo duro y tritordeum revelando diferencias genéticas importantes a nivel de especie. El proceso de desarrollo y maduración aconteció más rápidamente en trigo duro, mientras que tritordeum mostró

una activación de los procesos carotenogénicos en estadios previos a la maduración. La relación entre las ramas $\beta\epsilon/\beta\beta$ de la carotenogénesis en tritordeum experimenta un claro incremento traducido en un mayor contenido en luteína. El análisis de los genes carotenogénicos indicó un perfil de expresión temporal modulado por el estadio de desarrollo del grano. Los genes *psy1* y *εLcy* mostraron diferencias en la evolución de sus transcrito para ambos cereales. Mientras que tritordeum se caracterizó por una activación de ambos genes conforme avanzó el desarrollo de los granos, los granos de trigo duro experimentaron un descenso en los mismos. Estos datos son relevantes debido a la implicación de estos genes en el control de la acumulación y variabilidad del contenido carotenoide en cereales.

9. Los experimentos de almacenamientos en postcosecha de granos de trigo duro y tritordeum, puso de manifiesto la operatividad de las rutas de biosíntesis de carotenoides en ambos cereales cuyo alcance es dependiente del grado de madurez de las semillas. La esterificación de luteína por concurso de enzimas XAT en tritordeum se indujo y/o moduló por la temperatura, revelando que la ruta de esterificación continua operativa a lo largo del periodo de almacenamiento coincidiendo con la dormancia de la semilla. La mayor estabilidad de las xantofilas esterificadas, frente a las libres, explican las mayores tasas de retención de carotenoides en tritordeum.
10. El almacenamiento prolongado de los granos puso de manifiesto que el efecto de la esterificación de los pigmentos se traduce en una menor velocidad de degradación y una consecuente prolongación de la vida media del contenido carotenoide de los granos, siendo este efecto mayor para tritordeum. La estabilidad de los pigmentos esterificados aumentó con el grado de esterificación de los mismos. Las condiciones aplicadas revelaron diferencias de estabilidad en función del ácido graso implicado en la esterificación y su posición en la molécula de luteína.
11. La pérdida de compartimentación celular y el aumento de la superficie específica ocasionada por la molienda de los granos incrementa la posibilidad de degradación de los carotenoides presentes en harinas. El efecto de la temperatura durante el almacenamiento de harinas integrales de trigo duro y tritordeum fue basicamente catabólico obedeciendo a un modelo cinético de primer orden claramente dependiente de la temperatura. La esterificación también deporta para el pigmento una protección frente a la degradación en harinas, traducida en mayores tasas de retención. Las experiencias de almacenamiento prolongado de granos y harinas han permitido

proponer la existencia de un proceso de esterificación común para ambos cereales. Esta reacción de esterificación podría estar mediada por lipasas, presentando preferencia por la posición 3' de luteína y por el ácido linoleico. Las harinas integrales de tritordeum presentaron pérdidas más acusadas de carotenoides libres y esterificados, manifestando velocidades de degradación mayores que en trigo duro, que pudiera estar mediado por una mayor actividad esterificante en las harinas de éstos últimos.

12. Los resultados de la presente Tesis Doctoral indican que los estudios de biofortificación y mejora de cereales dirigidos al aumento del contenido carotenoide deberían basarse en la selección de variedades con mayor concentración de xantofilas esterificadas al objeto de incrementar la capacidad de acumulación de los mismos y su estabilidad en las semillas.

7. ANEXO.

Tabla A1. Evolución del peso del grano (mg)¹ durante el periodo de desarrollo y maduración en líneas avanzadas de tritordeum y variedades de trigo duro.

Cereal	Estadio de desarrollo ²				
	E1	E2	E3	E4	EF ³
Tritordeum					
HT 621	16.7 ± 1.2 ^a	20.6 ± 0.9 ^{ab}	32.8 ± 1.3 ^{ab}	49.2 ± 1.6 ^a	45.2 ± 0.6 ^{ab}
HT 630	16.8 ± 1.0 ^a	28.3 ± 0.5 ^c	34.1 ± 1.1 ^b	49.6 ± 1.2 ^a	38.9 ± 1.4 ^{cd}
HT 609	18.4 ± 0.9 ^a	23.5 ± 0.8 ^b	34.8 ± 0.6 ^b	58.1 ± 1.3 ^b	41.9 ± 1.1 ^{bd}
HT 240	18.5 ± 0.9 ^a	21.5 ± 0.8 ^{ab}	30.1 ± 2.1 ^{ac}	55.8 ± 2.3 ^b	43.8 ± 0.2 ^{ab}
HT 335	18.1 ± 1.5 ^a	18.4 ± 0.9 ^a	31.7 ± 0.8 ^{ab}	59.7 ± 2.3 ^b	47.5 ± 0.8 ^a
Promedio tritordeum	17.1 ± 0.5 ^A	22.4 ± 0.7 ^A	32.7 ± 0.6 ^A	54.5 ± 1.1 ^A	43.5 ± 1.1 ^A
Trigo duro					
Don Pedro	17.2 ± 0.6 ^a	31.2 ± 1.1 ^a	35.3 ± 0.7 ^a	66.0 ± 2.8 ^a	55.0 ± 0.1 ^a
Simeto	24.7 ± 1.1 ^b	31.3 ± 1.6 ^a	44.8 ± 0.9 ^b	83.3 ± 2.3 ^b	63.2 ± 0.5 ^b
Claudio	16.6 ± 2.2 ^a	24.3 ± 0.9 ^b	48.2 ± 1.4 ^c	68.1 ± 1.4 ^a	61.0 ± 1.0 ^b
Kofa	21.9 ± 1.4 ^b	23.6 ± 0.4 ^b	28.4 ± 1.1 ^d	66.3 ± 1.6 ^a	60.8 ± 0.1 ^b
UC1113	14.6 ± 0.3 ^a	30.2 ± 1.6 ^a	40.8 ± 0.7 ^e	68.0 ± 2.3 ^a	56.2 ± 0.1 ^a
Promedio trigo duro	19.0 ± 0.9 ^A	28.5 ± 0.8 ^B	39.5 ± 1.4 ^B	70.3 ± 1.5 ^B	59.2 ± 1.1 ^B

¹Los valores se corresponden con la media y el error estándar de la media para seis determinaciones (tres por bloque). Para cada estadio, y con respecto a cada tipo de muestra (trigo duro o tritordeum), los valores que muestran distinto superíndice presentan diferencias significativas (test de Duncan, p<0.05).

²Estadios de desarrollo: E1 (8 DDA), E2 (14 DDA), E3 (18 DDA), E4 (25 DDA) y EF (30 DDA; maduro, harvest).

³El peso del grano en el estado final (EF) se determinó como peso medio de 50 granos. El valor mostrado corresponde a la media entre bloques.

Tabla A2. Evolución del contenido en agua (% humedad)¹ del grano durante el periodo de desarrollo y maduración en líneas avanzadas de tritordeum y variedades de trigo duro.

Cereal	Estadio de desarrollo ²				
	E1	E2	E3	E4	EF ³
Tritordeum					
HT 621	65.3 ± 1.9 ^a	62.3 ± 0.8 ^b	63.7 ± 0.7 ^a	57.3 ± 1.3 ^a	11.4 ± 0.3 ^a
HT 630	68.2 ± 0.8 ^a	63.9 ± 1.1 ^{bcd}	64.0 ± 1.2 ^a	64.4 ± 2.1 ^b	10.5 ± 0.2 ^{bd}
HT 609	69.7 ± 1.8 ^a	62.8 ± 0.4 ^{ac}	64.1 ± 1.1 ^a	62.7 ± 0.8 ^b	10.9 ± 0.2 ^{acd}
HT 240	68.4 ± 1.3 ^a	66.6 ± 1.1 ^b	68.2 ± 1.2 ^b	64.0 ± 0.7 ^b	10.1 ± 0.2 ^b
HT 335	68.8 ± 0.5 ^a	62.9 ± 1.5 ^{ad}	65.0 ± 0.7 ^a	62.8 ± 0.2 ^b	10.6 ± 0.1 ^{bc}
Promedio tritordeum	68.1 ± 0.6 ^A	63.7 ± 0.5 ^A	65.0 ± 0.6 ^A	62.2 ± 0.9 ^A	10.7 ± 0.1 ^A
Trigo duro					
Don Pedro	64.5 ± 1.3 ^a	69.3 ± 1.0 ^a	67.0 ± 0.4 ^a	64.6 ± 1.4 ^a	9.7 ± 0.2 ^a
Simeto	70.1 ± 1.1 ^{bc}	68.9 ± 0.9 ^a	69.3 ± 0.3 ^{ab}	69.1 ± 1.0 ^b	9.4 ± 0.4 ^a
Claudio	68.0 ± 1.6 ^{ac}	68.4 ± 0.4 ^a	67.5 ± 1.0 ^a	64.6 ± 0.4 ^a	9.3 ± 0.2 ^a
Kofa	69.2 ± 0.2 ^{bc}	70.6 ± 1.3 ^a	68.5 ± 1.0 ^{ac}	63.7 ± 1.7 ^{ab}	9.2 ± 0.3 ^a
UC1113	70.0 ± 2.2 ^{bc}	70.1 ± 1.0 ^a	70.4 ± 0.6 ^{bc}	65.3 ± 1.6 ^a	8.9 ± 0.2 ^a
Promedio trigo duro	68.4 ± 0.7 ^A	69.6 ± 0.5 ^B	68.6 ± 0.4 ^B	65.4 ± 0.7 ^B	9.30 ± 0.1 ^B

¹Los valores se corresponden con la media y el error estándar de la media para cuatro determinaciones (dos por bloque). Para cada estadio, y con respecto a cada tipo de muestra (trigo duro o tritordeum), los valores que muestran distinto superíndice presentan diferencias significativas (test de Duncan, p<0.05).

²Estadios de desarrollo: E1 (8 DDA), E2 (14 DDA), E3 (18 DDA), E4 (25 DDA) y EF (30 DDA; maduro, harvest).

Tabla A3. Evolución del contenido de pigmentos individuales ($\mu\text{g/grano PS}$)¹ durante el desarrollo y maduración del grano de trigo duro (variedad Don Pedro).

Don Pedro	Estadio de desarrollo ²				
Carotenoide	E1	E2	E3	E4	EF
9'- <i>cis</i> -Neoxanteno	0.09 \pm 0.00 ^a	0.21 \pm 0.01 ^b	0.23 \pm 0.01 ^b	0.23 \pm 0.01 ^b	-
Violaxanteno ³	0.18 \pm 0.01 ^a	0.45 \pm 0.03 ^b	0.52 \pm 0.01 ^b	0.77 \pm 0.02 ^c	-
all- <i>trans</i> -Antheraxanteno	0.03 \pm 0.00 ^a	0.06 \pm 0.01 ^b	0.07 \pm 0.00 ^{bc}	0.08 \pm 0.00 ^c	-
all- <i>trans</i> -Zeaxanteno	0.01 \pm 0.00 ^a	0.02 \pm 0.00 ^b	0.02 \pm 0.00 ^b	0.03 \pm 0.00 ^c	0.01 \pm 0.00
Luteína ⁴	0.27 \pm 0.01 ^a	0.64 \pm 0.03 ^b	0.72 \pm 0.01 ^b	0.88 \pm 0.03 ^c	0.16 \pm 0.00
all- <i>trans</i> - β -Caroteno	0.12 \pm 0.01 ^a	0.27 \pm 0.01 ^b	0.30 \pm 0.00 ^b	0.28 \pm 0.01 ^b	0.00 \pm 0.00
Luteína monoéster ⁵	-	-	-	-	-
Luteína diéster ⁶	-	-	-	-	-
Clorofila <i>a</i>	4.54 \pm 0.19 ^a	10.64 \pm 0.71 ^b	11.09 \pm 0.13 ^b	10.65 \pm 0.49 ^b	-
Clorofila <i>b</i>	1.48 \pm 0.05 ^a	3.73 \pm 0.26 ^b	3.91 \pm 0.04 ^b	3.71 \pm 0.20 ^b	-
Luteína total ⁷	0.27 \pm 0.01 ^a	0.64 \pm 0.03 ^b	0.72 \pm 0.01 ^b	0.88 \pm 0.03 ^c	0.16 \pm 0.00
Carotenoides totales ⁸	0.69 \pm 0.03 ^a	1.66 \pm 0.10 ^b	1.85 \pm 0.03 ^b	2.27 \pm 0.08 ^c	0.18 \pm 0.01
Clorofilas totales ⁹	6.03 \pm 0.24 ^a	14.37 \pm 0.97 ^b	15.00 \pm 0.16 ^b	14.36 \pm 0.68 ^b	-
Relación Cl <i>a</i> /Cl <i>b</i>	3.06 \pm 0.04 ^a	2.85 \pm 0.01 ^b	2.83 \pm 0.02 ^b	2.87 \pm 0.04 ^b	-
Relación Cl total/Car total	8.69 \pm 0.17 ^a	8.65 \pm 0.08 ^a	8.10 \pm 0.20 ^b	6.32 \pm 0.16 ^c	-
Relación ramas $\beta\epsilon/\beta\beta$ ¹⁰	0.64 \pm 0.01 ^a	0.64 \pm 0.01 ^a	0.64 \pm 0.01 ^a	0.64 \pm 0.01 ^a	-

¹Los datos representan la media y el error estándar (n=4 para estadios E1-E4; n=8 para estadio EF). Letras superíndice diferentes para un mismo pigmento indican diferencias significativas ($p < 0.05$), determinadas por el test de Duncan, para el contenido en función del estadio de desarrollo.

²Estadios de desarrollo: E1 (8 DDA), E2 (14 DDA), E3 (18 DDA), E4 (25 DDA) y EF (30 DDA; maduro, harvest).

³Violaxanteno = all-*trans*-Violaxanteno + 9-*cis*-Violaxanteno + 13-*cis*-Violaxanteno

⁴Luteína = Luteína libre (all-*trans*-Luteína + 9-*cis*-Luteína + 13-*cis*-Luteína)

⁵Luteína monoéster = Luteína-3'-*O*-palmitato + Luteína-3-*O*-palmitato + Luteína-3'-*O*-linoleato + Luteína-3-*O*-linoleato

⁶Luteína diéster = Luteína-dipalmitato + Luteína-dilinoato + Luteína-palmitatolinoato

⁷Luteína total = Luteína libre + Luteína monoéster + Luteína diéster

⁸Carotenoides totales = 9'-*cis*-Neoxanteno + Violaxanteno + all-*trans*-Antheraxanteno + all-*trans*-Zeaxanteno + Luteína total + all-*trans*- β -Caroteno

⁹Clorofilas totales = Clorofila *a* + Clorofila *b*

¹⁰Relación ramas $\beta\epsilon/\beta\beta$ = (Luteína total)/(9'-*cis*-Neoxanteno + Violaxanteno + all-*trans*-Antheraxanteno + all-*trans*-Zeaxanteno + all-*trans*- β -Caroteno)

Tabla A4. Evolución del contenido de pigmentos individuales ($\mu\text{g/grano PS}$)¹ durante el desarrollo y maduración del grano de trigo duro (variedad Simeto).

Simeto	Estadio de desarrollo				
Carotenoide	E1	E2	E3	E4	EF
9'- <i>cis</i> -Neoxanteno	0.15 \pm 0.01 ^a	0.24 \pm 0.04 ^a	0.38 \pm 0.01 ^b	0.44 \pm 0.05 ^b	-
Violaxanteno ³	0.30 \pm 0.01 ^a	0.44 \pm 0.07 ^a	0.77 \pm 0.02 ^b	1.07 \pm 0.12 ^c	-
all- <i>trans</i> -Antheraxanteno	0.04 \pm 0.00 ^a	0.05 \pm 0.01 ^{ab}	0.07 \pm 0.01 ^b	0.10 \pm 0.01 ^c	-
all- <i>trans</i> -Zeaxanteno	0.02 \pm 0.00 ^a	0.02 \pm 0.00 ^a	0.02 \pm 0.00 ^b	0.04 \pm 0.00 ^c	0.02 \pm 0.00
Luteína ⁴	0.42 \pm 0.01 ^a	0.64 \pm 0.11 ^a	1.06 \pm 0.01 ^b	1.34 \pm 0.16 ^b	0.15 \pm 0.00
all- <i>trans</i> - β -Caroteno	0.18 \pm 0.01 ^a	0.30 \pm 0.05 ^b	0.50 \pm 0.02 ^c	0.43 \pm 0.03 ^c	0.00 \pm 0.00
Luteína monoéster ⁵	-	-	-	-	-
Luteína diéster ⁶	-	-	-	-	-
Clorofila <i>a</i>	7.72 \pm 0.24 ^a	12.21 \pm 1.81 ^b	18.21 \pm 0.75 ^c	17.72 \pm 1.83 ^c	-
Clorofila <i>b</i>	2.46 \pm 0.12 ^a	4.24 \pm 0.73 ^a	6.87 \pm 0.23 ^b	7.22 \pm 0.88 ^b	-
Luteína total ⁷	0.42 \pm 0.01 ^a	0.64 \pm 0.11 ^a	1.06 \pm 0.01 ^b	1.34 \pm 0.16 ^b	0.15 \pm 0.00
Carotenoides totales ⁸	1.11 \pm 0.03 ^a	1.69 \pm 0.28 ^a	2.81 \pm 0.07 ^b	3.43 \pm 0.37 ^b	0.17 \pm 0.00
Clorofilas totales ⁹	10.18 \pm 0.36 ^a	16.44 \pm 2.54 ^b	25.08 \pm 0.97 ^c	24.93 \pm 2.71 ^c	-
Relación Cl <i>a</i> /Cl <i>b</i>	3.14 \pm 0.06 ^a	2.92 \pm 0.08 ^b	2.65 \pm 0.03 ^c	2.47 \pm 0.06 ^c	-
Relación Cl total/Car total	9.18 \pm 0.11 ^a	9.79 \pm 0.15 ^b	8.92 \pm 0.15 ^a	7.27 \pm 0.05 ^c	-
Relación ramas $\beta\epsilon/\beta\beta$ ¹⁰	0.62 \pm 0.02 ^a	0.60 \pm 0.01 ^a	0.60 \pm 0.01 ^a	0.64 \pm 0.02 ^a	-

¹Los datos representan la media y el error estándar (n=4 para estadios E1-E4; n=8 para estadio EF). Letras superíndice diferentes para un mismo pigmento indican diferencias significativas ($p < 0.05$), determinadas por el test de Duncan, para el contenido en función del estadio de desarrollo.

²Estadios de desarrollo: E1 (8 DDA), E2 (14 DDA), E3 (18 DDA), E4 (25 DDA) y EF (30 DDA; maduro, harvest).

³Violaxanteno = all-*trans*-Violaxanteno + 9-*cis*-Violaxanteno + 13-*cis*-Violaxanteno

⁴Luteína = Luteína libre (all-*trans*-Luteína + 9-*cis*-Luteína + 13-*cis*-Luteína)

⁵Luteína monoéster = Luteína-3'-*O*-palmitato + Luteína-3-*O*-palmitato + Luteína-3'-*O*-linoleato + Luteína-3-*O*-linoleato

⁶Luteína diéster = Luteína-dipalmitato + Luteína-dilinoato + Luteína-palmitatolinoato

⁷Luteína total = Luteína libre + Luteína monoéster + Luteína diéster

⁸Carotenoides totales = 9'-*cis*-Neoxanteno + Violaxanteno + all-*trans*-Antheraxanteno + all-*trans*-Zeaxanteno + Luteína total + all-*trans*- β -Caroteno

⁹Clorofilas totales = Clorofila *a* + Clorofila *b*

¹⁰Relación ramas $\beta\epsilon/\beta\beta$ = (Luteína total)/(9'-*cis*-Neoxanteno + Violaxanteno + all-*trans*-Antheraxanteno + all-*trans*-Zeaxanteno + all-*trans*- β -Caroteno)

Tabla A5. Evolución del contenido de pigmentos individuales ($\mu\text{g/grano PS}$)¹ durante el desarrollo y maduración del grano de trigo duro (variedad Claudio).

Claudio	Estadio de desarrollo				
	E1	E2	E3	E4	EF
9'- <i>cis</i> -Neoxanteno	0.10 ± 0.02^a	0.20 ± 0.01^b	0.32 ± 0.01^c	0.33 ± 0.04^c	-
Violaxanteno ³	0.21 ± 0.03^a	0.37 ± 0.02^b	0.66 ± 0.01^c	0.79 ± 0.07^c	-
all- <i>trans</i> -Anteraxanteno	0.02 ± 0.00^a	0.05 ± 0.00^b	0.05 ± 0.00^b	0.06 ± 0.00^c	-
all- <i>trans</i> -Zeaxanteno	0.01 ± 0.01^a	0.01 ± 0.00^a	0.01 ± 0.00^a	0.03 ± 0.00^b	0.01 ± 0.00
Luteína ⁴	0.29 ± 0.05^a	0.62 ± 0.00^b	0.98 ± 0.03^c	1.03 ± 0.11^c	0.14 ± 0.00
all- <i>trans</i> - β -Caroteno	0.12 ± 0.02^a	0.26 ± 0.00^b	0.38 ± 0.01^c	0.36 ± 0.04^c	0.00 ± 0.00
Luteína monoéster ⁵	-	-	-	-	-
Luteína diéster ⁶	-	-	-	-	-
Clorofila <i>a</i>	4.72 ± 1.01^a	10.29 ± 0.54^b	14.77 ± 0.27^c	14.16 ± 1.60^c	-
Clorofila <i>b</i>	1.51 ± 0.31^a	3.50 ± 0.17^b	5.43 ± 0.13^c	5.59 ± 0.77^c	-
Luteína total ⁷	0.29 ± 0.05^a	0.62 ± 0.01^b	0.98 ± 0.03^c	1.03 ± 0.11^c	0.14 ± 0.00
Carotenoides totales ⁸	0.75 ± 0.12^a	1.51 ± 0.05^b	2.41 ± 0.05^c	2.60 ± 0.26^c	0.15 ± 0.00
Clorofilas totales ⁹	6.23 ± 1.32^a	13.79 ± 0.71^b	20.21 ± 0.40^c	19.75 ± 2.37^c	-
Relación Cl <i>a</i> /Cl <i>b</i>	3.11 ± 0.05^a	2.94 ± 0.01^a	2.72 ± 0.03^b	2.56 ± 0.07^b	-
Relación Cl total/Car total	8.08 ± 0.46^a	9.16 ± 0.16^b	8.40 ± 0.12^{ab}	7.56 ± 0.15^a	-
Relación ramas $\beta\epsilon/\beta\beta$ ¹⁰	0.62 ± 0.03^a	0.71 ± 0.01^b	0.69 ± 0.01^b	0.66 ± 0.01^{ab}	-

¹Los datos representan la media y el error estándar (n=4 para estadios E1-E4; n=8 para estadio EF). Letras superíndice diferentes para un mismo pigmento indican diferencias significativas ($p < 0.05$), determinadas por el test de Duncan, para el contenido en función del estadio de desarrollo.

²Estadios de desarrollo: E1 (8 DDA), E2 (14 DDA), E3 (18 DDA), E4 (25 DDA) y EF (30 DDA; maduro, harvest).

³Violaxanteno = all-*trans*-Violaxanteno + 9-*cis*-Violaxanteno + 13-*cis*-Violaxanteno

⁴Luteína = Luteína libre (all-*trans*-Luteína + 9-*cis*-Luteína + 13-*cis*-Luteína)

⁵Luteína monoéster = Luteína-3'-*O*-palmitato + Luteína-3-*O*-palmitato + Luteína-3'-*O*-linoleato + Luteína-3-*O*-linoleato

⁶Luteína diéster = Luteína-dipalmitato + Luteína-dilinoato + Luteína-palmitatolinoato

⁷Luteína total = Luteína libre + Luteína monoéster + Luteína diéster

⁸Carotenoides totales = 9'-*cis*-Neoxanteno + Violaxanteno + all-*trans*-Anteraxanteno + all-*trans*-Zeaxanteno + Luteína total + all-*trans*- β -Caroteno

⁹Clorofilas totales = Clorofila *a* + Clorofila *b*

¹⁰Relación ramas $\beta\epsilon/\beta\beta$ = (Luteína total)/(9'-*cis*-Neoxanteno + Violaxanteno + all-*trans*-Anteraxanteno + all-*trans*-Zeaxanteno + all-*trans*- β -Caroteno)

Tabla A6. Evolución del contenido de pigmentos individuales ($\mu\text{g/grano PS}$)¹ durante el desarrollo y maduración del grano de trigo duro (variedad Kofa).

Kofa	Estadio de desarrollo				
Carotenoide	E1	E2	E3	E4	EF
9'- <i>cis</i> -Neoxanteno	0.14 \pm 0.01 ^a	0.16 \pm 0.03 ^a	0.22 \pm 0.01 ^b	0.31 \pm 0.01 ^c	-
Violaxanteno ³	0.28 \pm 0.03 ^a	0.30 \pm 0.05 ^a	0.44 \pm 0.03 ^b	0.92 \pm 0.02 ^c	-
all- <i>trans</i> -Anteraxanteno	0.03 \pm 0.01 ^a	0.04 \pm 0.01 ^a	0.06 \pm 0.00 ^b	0.09 \pm 0.00 ^c	-
all- <i>trans</i> -Zeaxanteno	0.01 \pm 0.00 ^a	0.01 \pm 0.00 ^a	0.02 \pm 0.00 ^b	0.03 \pm 0.00 ^c	0.02 \pm 0.00
Luteína ⁴	0.40 \pm 0.03 ^a	0.50 \pm 0.05 ^a	0.64 \pm 0.03 ^b	1.08 \pm 0.05 ^c	0.29 \pm 0.00
all- <i>trans</i> - β -Caroteno	0.17 \pm 0.02 ^a	0.22 \pm 0.02 ^a	0.28 \pm 0.02 ^b	0.35 \pm 0.01 ^c	0.00 \pm 0.00
Luteína monoéster ⁵	-	-	-	-	-
Luteína diéster ⁶	-	-	-	-	-
Clorofila <i>a</i>	6.11 \pm 0.42 ^a	8.36 \pm 0.64 ^b	9.26 \pm 0.87 ^b	11.70 \pm 0.21 ^c	-
Clorofila <i>b</i>	2.19 \pm 0.24 ^a	2.74 \pm 0.29 ^a	3.49 \pm 0.19 ^b	4.58 \pm 0.22 ^c	-
Luteína total ⁷	0.40 \pm 0.03 ^a	0.50 \pm 0.05 ^a	0.64 \pm 0.03 ^b	1.08 \pm 0.05 ^c	0.29 \pm 0.00
Carotenoides totales ⁸	1.04 \pm 0.10 ^a	1.24 \pm 0.15 ^a	1.66 \pm 0.08 ^b	2.78 \pm 0.08 ^c	0.31 \pm 0.00
Clorofilas totales ⁹	8.30 \pm 0.65 ^a	11.10 \pm 0.93 ^b	12.75 \pm 1.06 ^b	16.28 \pm 0.40 ^c	-
Relación Cl <i>a</i> /Cl <i>b</i>	2.84 \pm 0.14 ^{ab}	3.07 \pm 0.09 ^b	2.64 \pm 0.11 ^a	2.56 \pm 0.09 ^a	-
Relación Cl total/Car total	7.98 \pm 0.17 ^a	9.11 \pm 0.36 ^b	7.66 \pm 0.26 ^a	5.85 \pm 0.09 ^c	-
Relación ramas $\beta\epsilon/\beta\beta$ ¹⁰	0.63 \pm 0.01 ^{ab}	0.69 \pm 0.03 ^b	0.62 \pm 0.00 ^a	0.64 \pm 0.01 ^{ab}	-

¹Los datos representan la media y el error estándar (n=4 para estadios E1-E4; n=8 para estadio EF). Letras superíndice diferentes para un mismo pigmento indican diferencias significativas ($p < 0.05$), determinadas por el test de Duncan, para el contenido en función del estadio de desarrollo.

²Estadios de desarrollo: E1 (8 DDA), E2 (14 DDA), E3 (18 DDA), E4 (25 DDA) y EF (30 DDA; maduro, harvest).

³Violaxanteno = all-*trans*-Violaxanteno + 9-*cis*-Violaxanteno + 13-*cis*-Violaxanteno

⁴Luteína = Luteína libre (all-*trans*-Luteína + 9-*cis*-Luteína + 13-*cis*-Luteína)

⁵Luteína monoéster = Luteína-3'-*O*-palmitato + Luteína-3-*O*-palmitato + Luteína-3'-*O*-linoleato + Luteína-3-*O*-linoleato

⁶Luteína diéster = Luteína-dipalmitato + Luteína-dilinoato + Luteína-palmitatolinoato

⁷Luteína total = Luteína libre + Luteína monoéster + Luteína diéster

⁸Carotenoides totales = 9'-*cis*-Neoxanteno + Violaxanteno + all-*trans*-Anteraxanteno + all-*trans*-Zeaxanteno + Luteína total + all-*trans*- β -Caroteno

⁹Clorofilas totales = Clorofila *a* + Clorofila *b*

¹⁰Relación ramas $\beta\epsilon/\beta\beta$ = (Luteína total)/(9'-*cis*-Neoxanteno + Violaxanteno + all-*trans*-Anteraxanteno + all-*trans*-Zeaxanteno + all-*trans*- β -Caroteno)

Tabla A7. Evolución del contenido de pigmentos individuales ($\mu\text{g/grano PS}$)¹ durante el desarrollo y maduración del grano de trigo duro (variedad UC1113).

UC1113	Estadio de desarrollo				
Carotenoide	E1	E2	E3	E4	EF
9'- <i>cis</i> -Neoxanteno	0.06 \pm 0.01 ^a	0.22 \pm 0.01 ^b	0.34 \pm 0.01 ^c	0.32 \pm 0.03 ^c	-
Violaxanteno ³	0.14 \pm 0.01 ^a	0.40 \pm 0.02 ^b	0.65 \pm 0.02 ^c	0.77 \pm 0.04 ^c	-
all- <i>trans</i> -Antheraxanteno	0.02 \pm 0.00 ^a	0.06 \pm 0.00 ^b	0.07 \pm 0.00 ^c	0.08 \pm 0.00 ^c	-
all- <i>trans</i> -Zeaxanteno	0.01 \pm 0.00 ^a	0.02 \pm 0.00 ^b	0.02 \pm 0.00 ^b	0.04 \pm 0.00 ^c	0.01 \pm 0.00
Luteína ⁴	0.19 \pm 0.02 ^a	0.66 \pm 0.03 ^b	1.00 \pm 0.03 ^c	1.01 \pm 0.06 ^c	0.13 \pm 0.01
all- <i>trans</i> - β -Caroteno	0.07 \pm 0.01 ^a	0.28 \pm 0.01 ^b	0.40 \pm 0.01 ^c	0.34 \pm 0.03 ^c	0.00 \pm 0.00
Luteína monoéster ⁵	-	-	-	-	-
Luteína diéster ⁶	-	-	-	-	-
Clorofila <i>a</i>	2.75 \pm 0.33 ^a	10.25 \pm 0.33 ^b	14.81 \pm 0.25 ^c	13.38 \pm 1.12 ^c	-
Clorofila <i>b</i>	0.81 \pm 0.10 ^a	3.48 \pm 0.12 ^b	5.29 \pm 0.12 ^c	4.79 \pm 0.55 ^c	-
Luteína total ⁷	0.19 \pm 0.02 ^a	0.66 \pm 0.03 ^b	1.00 \pm 0.03 ^c	1.01 \pm 0.06 ^c	0.13 \pm 0.01
Carotenoides totales ⁸	0.49 \pm 0.05 ^a	1.64 \pm 0.08 ^b	2.47 \pm 0.07 ^c	2.56 \pm 0.16 ^c	0.15 \pm 0.01
Clorofilas totales ⁹	3.56 \pm 0.44 ^a	13.73 \pm 0.45 ^b	20.11 \pm 0.35 ^c	18.18 \pm 1.67 ^c	-
Relación Cl <i>a</i> /Cl <i>b</i>	3.41 \pm 0.05 ^a	2.95 \pm 0.02 ^b	2.80 \pm 0.03 ^b	2.82 \pm 0.09 ^b	-
Relación Cl total/Car total	7.27 \pm 0.16 ^a	8.41 \pm 0.13 ^b	8.14 \pm 0.11 ^b	7.07 \pm 0.23 ^a	-
Relación ramas $\beta\epsilon/\beta\beta$ ¹⁰	0.65 \pm 0.01 ^a	0.68 \pm 0.01 ^b	0.68 \pm 0.01 ^b	0.66 \pm 0.01 ^{ab}	-

¹ Los datos representan la media y el error estándar (n=4 para estadios E1-E4; n=8 para estadio EF). Letras superíndice diferentes para un mismo pigmento indican diferencias significativas ($p < 0.05$), determinadas por el test de Duncan, para el contenido en función del estadio de desarrollo.

² Estadios de desarrollo: E1 (8 DDA), E2 (14 DDA), E3 (18 DDA), E4 (25 DDA) y EF (30 DDA; maduro, harvest).

³ Violaxanteno = all-*trans*-Violaxanteno + 9-*cis*-Violaxanteno + 13-*cis*-Violaxanteno

⁴ Luteína = Luteína libre (all-*trans*-Luteína + 9-*cis*-Luteína + 13-*cis*-Luteína)

⁵ Luteína monoéster = Luteína-3'-*O*-palmitato + Luteína-3-*O*-palmitato + Luteína-3'-*O*-linoleato + Luteína-3-*O*-linoleato

⁶ Luteína diéster = Luteína-dipalmitato + Luteína-dilinooleato + Luteína-palmitatolinooleato

⁷ Luteína total = Luteína libre + Luteína monoéster + Luteína diéster

⁸ Carotenoides totales = 9'-*cis*-Neoxanteno + Violaxanteno + all-*trans*-Antheraxanteno + all-*trans*-Zeaxanteno + Luteína total + all-*trans*- β -Caroteno

⁹ Clorofilas totales = Clorofila *a* + Clorofila *b*

¹⁰ Relación ramas $\beta\epsilon/\beta\beta$ = (Luteína total)/(9'-*cis*-Neoxanteno + Violaxanteno + all-*trans*-Antheraxanteno + all-*trans*-Zeaxanteno + all-*trans*- β -Caroteno)

Tabla A8. Evolución del contenido de pigmentos individuales ($\mu\text{g/grano PS}$)¹ durante el desarrollo y maduración del grano de tritordeum (variedad HT621).

HT621	Estadio de desarrollo				
Carotenoide	E1	E2	E3	E4	EF
9'- <i>cis</i> -Neoxanteno	0.07 \pm 0.01 ^a	0.12 \pm 0.00 ^b	0.19 \pm 0.01 ^c	0.16 \pm 0.01 ^c	-
Violaxanteno ³	0.16 \pm 0.03 ^a	0.23 \pm 0.01 ^a	0.42 \pm 0.03 ^b	0.50 \pm 0.00 ^c	-
all- <i>trans</i> -Anteraxanteno	0.02 \pm 0.00 ^a	0.04 \pm 0.00 ^b	0.06 \pm 0.00 ^c	0.06 \pm 0.00 ^c	-
all- <i>trans</i> -Zeaxanteno	0.01 \pm 0.00 ^a	0.01 \pm 0.00 ^b	0.02 \pm 0.00 ^c	0.02 \pm 0.00 ^c	-
Luteína ⁴	0.19 \pm 0.03 ^a	0.33 \pm 0.01 ^b	0.64 \pm 0.05 ^c	0.73 \pm 0.02 ^d	0.32 \pm 0.00
all- <i>trans</i> - β -Caroteno	0.08 \pm 0.02 ^a	0.14 \pm 0.00 ^b	0.23 \pm 0.01 ^c	0.20 \pm 0.00 ^c	0.004 \pm 0.000
Luteína monoéster ⁵	-	-	-	-	0.12 \pm 0.00
Luteína diéster ⁶	-	-	-	-	0.02 \pm 0.00
Clorofila <i>a</i>	3.11 \pm 0.69 ^a	5.62 \pm 0.04 ^b	9.11 \pm 0.48 ^c	7.43 \pm 0.33 ^d	-
Clorofila <i>b</i>	0.96 \pm 0.22 ^a	1.82 \pm 0.02 ^b	2.96 \pm 0.17 ^c	2.37 \pm 0.09 ^d	-
Luteína total ⁷	0.19 \pm 0.03 ^a	0.33 \pm 0.01 ^b	0.64 \pm 0.05 ^c	0.73 \pm 0.02 ^d	0.46 \pm 0.00
Carotenoides totales ⁸	0.53 \pm 0.09 ^a	0.87 \pm 0.02 ^b	1.55 \pm 0.10 ^c	1.67 \pm 0.02 ^c	0.47 \pm 0.00
Clorofilas totales ⁹	4.08 \pm 0.91 ^a	7.44 \pm 0.06 ^b	12.07 \pm 0.66 ^c	9.80 \pm 0.42 ^d	-
Relación Cl <i>a</i> /Cl <i>b</i>	3.24 \pm 0.03 ^a	3.08 \pm 0.00 ^b	3.08 \pm 0.02 ^b	3.14 \pm 0.05 ^b	-
Relación Cl total/Car total	7.46 \pm 0.41 ^a	8.60 \pm 0.11 ^b	7.79 \pm 0.14 ^a	5.86 \pm 0.21 ^c	-
Relación ramas $\beta\epsilon/\beta\beta$ ¹⁰	0.58 \pm 0.01 ^a	0.61 \pm 0.01 ^a	0.70 \pm 0.01 ^b	0.78 \pm 0.02 ^c	-

¹Los datos representan la media y el error estándar (n=4 para estadios E1-E4; n=8 para estadio EF). Letras superíndice diferentes para un mismo pigmento indican diferencias significativas ($p < 0.05$), determinadas por el test de Duncan, para el contenido en función del estadio de desarrollo.

²Estadios de desarrollo: E1 (8 DDA), E2 (14 DDA), E3 (18 DDA), E4 (25 DDA) y EF (30 DDA; maduro, harvest).

³Violaxanteno = all-*trans*-Violaxanteno + 9'-*cis*-Violaxanteno + 13'-*cis*-Violaxanteno

⁴Luteína = Luteína libre (all-*trans*-Luteína + 9'-*cis*-Luteína + 13'-*cis*-Luteína)

⁵Luteína monoéster = Luteína-3'-*O*-palmitato + Luteína-3-*O*-palmitato + Luteína-3'-*O*-linoleato + Luteína-3-*O*-linoleato

⁶Luteína diéster = Luteína-dipalmitato + Luteína-dilinoato + Luteína-palmitatolinoato

⁷Luteína total = Luteína libre + Luteína monoéster + Luteína diéster

⁸Carotenoides totales = 9'-*cis*-Neoxanteno + Violaxanteno + all-*trans*-Anteraxanteno + all-*trans*-Zeaxanteno + Luteína total + all-*trans*- β -Caroteno

⁹Clorofilas totales = Clorofila *a* + Clorofila *b*

¹⁰Relación ramas $\beta\epsilon/\beta\beta$ = (Luteína total)/(9'-*cis*-Neoxanteno + Violaxanteno + all-*trans*-Anteraxanteno + all-*trans*-Zeaxanteno + all-*trans*- β -Caroteno)

Tabla A9. Evolución del contenido de pigmentos individuales ($\mu\text{g/grano PS}$)¹ durante el desarrollo y maduración del grano de tritordeum (variedad HT630).

HT630	Estadio de desarrollo				
Carotenoide	E1	E2	E3	E4	EF
9'- <i>cis</i> -Neoxanteno	0.11 \pm 0.01 ^a	0.21 \pm 0.02 ^b	0.27 \pm 0.01 ^c	0.32 \pm 0.02 ^d	-
Violaxanteno ³	0.23 \pm 0.02 ^a	0.46 \pm 0.03 ^b	0.61 \pm 0.03 ^c	0.82 \pm 0.03 ^d	-
all- <i>trans</i> -Antheraxanteno	0.03 \pm 0.00 ^a	0.06 \pm 0.00 ^b	0.09 \pm 0.01 ^c	0.08 \pm 0.00 ^c	-
all- <i>trans</i> -Zeaxanteno	0.01 \pm 0.00 ^a	0.02 \pm 0.00 ^b	0.03 \pm 0.00 ^c	0.03 \pm 0.00 ^c	-
Luteína ⁴	0.36 \pm 0.02 ^a	0.64 \pm 0.05 ^b	0.94 \pm 0.06 ^c	1.23 \pm 0.01 ^d	0.24 \pm 0.01
all- <i>trans</i> - β -Caroteno	0.13 \pm 0.01 ^a	0.29 \pm 0.01 ^b	0.34 \pm 0.01 ^c	0.40 \pm 0.02 ^d	0.003 \pm 0.000
Luteína monoéster ⁵	-	-	-	-	0.15 \pm 0.00
Luteína diéster ⁶	-	-	-	-	0.04 \pm 0.00
Clorofila <i>a</i>	5.20 \pm 0.52 ^a	10.62 \pm 0.62 ^b	12.94 \pm 0.59 ^c	14.86 \pm 0.80 ^c	-
Clorofila <i>b</i>	1.75 \pm 0.18 ^a	3.47 \pm 0.26 ^b	4.25 \pm 0.21 ^c	5.10 \pm 0.28 ^d	-
Luteína total ⁷	0.36 \pm 0.02 ^a	0.64 \pm 0.05 ^b	0.94 \pm 0.06 ^c	1.23 \pm 0.01 ^d	0.43 \pm 0.02
Carotenoides totales ⁸	0.88 \pm 0.07 ^a	1.67 \pm 0.10 ^b	2.28 \pm 0.13 ^c	2.88 \pm 0.06 ^d	0.43 \pm 0.02
Clorofilas totales ⁹	6.95 \pm 0.70 ^a	14.09 \pm 0.88 ^b	17.18 \pm 0.79 ^c	19.97 \pm 1.08 ^d	-
Relación Cl <i>a</i> /Cl <i>b</i>	2.97 \pm 0.02 ^{ab}	3.08 \pm 0.06 ^b	3.05 \pm 0.03 ^b	2.91 \pm 0.01 ^a	-
Relación Cl total/Car total	7.86 \pm 0.19 ^a	8.43 \pm 0.03 ^b	7.55 \pm 0.16 ^a	6.92 \pm 0.22 ^c	-
Relación ramas $\beta\epsilon/\beta\beta$ ¹⁰	0.71 \pm 0.02 ^a	0.62 \pm 0.01 ^b	0.70 \pm 0.02 ^a	0.75 \pm 0.03 ^a	-

¹ Los datos representan la media y el error estándar (n=4 para estadios E1-E4; n=8 para estadio EF). Letras superíndice diferentes para un mismo pigmento indican diferencias significativas ($p < 0.05$), determinadas por el test de Duncan, para el contenido en función del estadio de desarrollo.

² Estadios de desarrollo: E1 (8 DDA), E2 (14 DDA), E3 (18 DDA), E4 (25 DDA) y EF (30 DDA; maduro, harvest).

³ Violaxanteno = all-*trans*-Violaxanteno + 9-*cis*-Violaxanteno + 13-*cis*-Violaxanteno

⁴ Luteína = Luteína libre (all-*trans*-Luteína + 9-*cis*-Luteína + 13-*cis*-Luteína)

⁵ Luteína monoéster = Luteína-3'-*O*-palmitato + Luteína-3-*O*-palmitato + Luteína-3'-*O*-linoleato + Luteína-3-*O*-linoleato

⁶ Luteína diéster = Luteína-dipalmitato + Luteína-dilinoato + Luteína-palmitatolinoato

⁷ Luteína total = Luteína libre + Luteína monoéster + Luteína diéster

⁸ Carotenoides totales = 9'-*cis*-Neoxanteno + Violaxanteno + all-*trans*-Antheraxanteno + all-*trans*-Zeaxanteno + Luteína total + all-*trans*- β -Caroteno

⁹ Clorofilas totales = Clorofila *a* + Clorofila *b*

¹⁰ Relación ramas $\beta\epsilon/\beta\beta$ = (Luteína total)/(9'-*cis*-Neoxanteno + Violaxanteno + all-*trans*-Antheraxanteno + all-*trans*-Zeaxanteno + all-*trans*- β -Caroteno)

Tabla A10. Evolución del contenido de pigmentos individuales ($\mu\text{g/grano PS}$)¹ durante el desarrollo y maduración del grano de tritordeum (variedad HT609).

HT609	Estadio de desarrollo				
Carotenoide	E1	E2	E3	E4	EF
9'- <i>cis</i> -Neoxanteno	0.11 ± 0.02^a	0.18 ± 0.01^b	0.17 ± 0.01^b	0.21 ± 0.01^b	-
Violaxanteno ³	0.24 ± 0.03^a	0.38 ± 0.02^b	0.43 ± 0.02^b	0.68 ± 0.01^c	-
all- <i>trans</i> -Anteraxanteno	0.04 ± 0.00^a	0.06 ± 0.01^b	0.08 ± 0.00^c	0.09 ± 0.00^c	-
all- <i>trans</i> -Zeaxanteno	0.01 ± 0.00^a	0.02 ± 0.00^b	0.02 ± 0.00^c	0.02 ± 0.00^d	-
Luteína ⁴	0.34 ± 0.05^a	0.52 ± 0.04^b	0.64 ± 0.04^b	1.04 ± 0.02^c	0.23 ± 0.00
all- <i>trans</i> - β -Caroteno	0.14 ± 0.02^a	0.24 ± 0.01^b	0.24 ± 0.01^b	0.28 ± 0.00^c	0.004 ± 0.000
Luteína monoéster ⁵	-	-	-	-	0.11 ± 0.00
Luteína diéster ⁶	-	-	-	-	0.03 ± 0.00
Clorofila <i>a</i>	5.31 ± 0.72^a	8.93 ± 0.59^b	8.78 ± 0.28^b	9.68 ± 0.28^b	-
Clorofila <i>b</i>	1.62 ± 0.21^a	2.83 ± 0.19^b	2.75 ± 0.10^b	3.02 ± 0.12^b	-
Luteína total ⁷	0.34 ± 0.05^a	0.52 ± 0.04^b	0.64 ± 0.04^b	1.04 ± 0.02^c	0.37 ± 0.00
Carotenoides totales ⁸	0.88 ± 0.12^a	1.39 ± 0.10^b	1.59 ± 0.07^b	2.33 ± 0.04^c	0.38 ± 0.00
Clorofilas totales ⁹	6.93 ± 0.93^a	11.75 ± 0.79^b	11.53 ± 0.38^b	12.70 ± 0.39^b	-
Relación Cl <i>a</i> /Cl <i>b</i>	3.28 ± 0.08^a	3.16 ± 0.00^a	3.19 ± 0.04^a	3.21 ± 0.04^a	-
Relación Cl total/Car total	7.85 ± 0.13^a	8.45 ± 0.05^b	7.26 ± 0.20^c	5.46 ± 0.18^d	-
Relación ramas $\beta\epsilon/\beta\beta$ ¹⁰	0.62 ± 0.02^a	0.59 ± 0.01^a	0.68 ± 0.01^b	0.81 ± 0.01^c	-

¹Los datos representan la media y el error estándar ($n=4$ para estadios E1-E4; $n=8$ para estadio EF). Letras superíndice diferentes para un mismo pigmento indican diferencias significativas ($p<0.05$), determinadas por el test de Duncan, para el contenido en función del estadio de desarrollo.

²Estadios de desarrollo: E1 (8 DDA), E2 (14 DDA), E3 (18 DDA), E4 (25 DDA) y EF (30 DDA; maduro, harvest).

³Violaxanteno = all-*trans*-Violaxanteno + 9-*cis*-Violaxanteno + 13-*cis*-Violaxanteno

⁴Luteína = Luteína libre (all-*trans*-Luteína + 9-*cis*-Luteína + 13-*cis*-Luteína)

⁵Luteína monoéster = Luteína-3'-*O*-palmitato + Luteína-3-*O*-palmitato + Luteína-3'-*O*-linoleato + Luteína-3-*O*-linoleato

⁶Luteína diéster = Luteína-dipalmitato + Luteína-dilinoato + Luteína-palmitatolinoato

⁷Luteína total = Luteína libre + Luteína monoéster + Luteína diéster

⁸Carotenoides totales = 9'-*cis*-Neoxanteno + Violaxanteno + all-*trans*-Anteraxanteno + all-*trans*-Zeaxanteno + Luteína total + all-*trans*- β -Caroteno

⁹Clorofilas totales = Clorofila *a* + Clorofila *b*

¹⁰Relación ramas $\beta\epsilon/\beta\beta$ = (Luteína total)/(9'-*cis*-Neoxanteno + Violaxanteno + all-*trans*-Anteraxanteno + all-*trans*-Zeaxanteno + all-*trans*- β -Caroteno)

Tabla A11. Evolución del contenido de pigmentos individuales ($\mu\text{g/grano PS}$)¹ durante el desarrollo y maduración del grano de tritordeum (variedad HT240).

HT240	Estadio de desarrollo				
Carotenoide	E1	E2	E3	E4	EF
9'- <i>cis</i> -Neoxanteno	0.09 \pm 0.00 ^a	0.12 \pm 0.02 ^a	0.21 \pm 0.01 ^b	0.22 \pm 0.01 ^b	-
Violaxanteno ³	0.20 \pm 0.01 ^a	0.24 \pm 0.02 ^a	0.43 \pm 0.03 ^b	0.63 \pm 0.03 ^c	-
all- <i>trans</i> -Anteraxanteno	0.03 \pm 0.00 ^a	0.03 \pm 0.01 ^a	0.06 \pm 0.00 ^b	0.07 \pm 0.00 ^b	-
all- <i>trans</i> -Zeaxanteno	0.01 \pm 0.00 ^a	0.01 \pm 0.00 ^a	0.02 \pm 0.00 ^b	0.02 \pm 0.00 ^b	-
Luteína ⁴	0.25 \pm 0.00 ^a	0.33 \pm 0.05 ^a	0.63 \pm 0.03 ^b	0.94 \pm 0.05 ^c	0.30 \pm 0.01
all- <i>trans</i> - β -Caroteno	0.12 \pm 0.00 ^a	0.15 \pm 0.02 ^a	0.26 \pm 0.02 ^b	0.28 \pm 0.02 ^b	0.003 \pm 0.000
Luteína monoéster ⁵	-	-	-	-	0.08 \pm 0.00
Luteína diéster ⁶	-	-	-	-	0.01 \pm 0.00
Clorofila <i>a</i>	4.51 \pm 0.15 ^a	5.80 \pm 0.84 ^a	9.62 \pm 0.80 ^b	9.99 \pm 0.71 ^b	-
Clorofila <i>b</i>	1.45 \pm 0.10 ^a	1.94 \pm 0.23 ^a	3.26 \pm 0.29 ^b	3.49 \pm 0.19 ^b	-
Luteína total ⁷	0.25 \pm 0.00 ^a	0.33 \pm 0.05 ^a	0.63 \pm 0.03 ^b	0.94 \pm 0.05 ^c	0.38 \pm 0.01
Carotenoides totales ⁸	0.7 \pm 0.02 ^a	0.87 \pm 0.12 ^a	1.61 \pm 0.08 ^b	2.16 \pm 0.11 ^c	0.38 \pm 0.01
Clorofilas totales ⁹	5.96 \pm 0.25 ^a	7.74 \pm 1.07 ^a	12.88 \pm 1.08 ^b	13.48 \pm 0.9 ^b	-
Relación Cl <i>a</i> /Cl <i>b</i>	3.14 \pm 0.12 ^a	2.97 \pm 0.10 ^a	2.95 \pm 0.07 ^a	2.86 \pm 0.05 ^a	-
Relación Cl total/Car total	8.51 \pm 0.14 ^{ab}	8.85 \pm 0.05 ^b	7.98 \pm 0.32 ^a	6.22 \pm 0.15 ^c	-
Relación ramas $\beta\epsilon/\beta\beta$ ¹⁰	0.57 \pm 0.03 ^a	0.59 \pm 0.03 ^a	0.64 \pm 0.02 ^a	0.77 \pm 0.01 ^b	-

¹ Los datos representan la media y el error estándar (n=4 para estadios E1-E4; n=8 para estadio EF). Letras superíndice diferentes para un mismo pigmento indican diferencias significativas ($p < 0.05$), determinadas por el test de Duncan, para el contenido en función del estadio de desarrollo.

² Estadios de desarrollo: E1 (8 DDA), E2 (14 DDA), E3 (18 DDA), E4 (25 DDA) y EF (30 DDA; maduro, harvest).

³ Violaxanteno = all-*trans*-Violaxanteno + 9-*cis*-Violaxanteno + 13-*cis*-Violaxanteno

⁴ Luteína = Luteína libre (all-*trans*-Luteína + 9-*cis*-Luteína + 13-*cis*-Luteína)

⁵ Luteína monoéster = Luteína-3'-*O*-palmitato + Luteína-3-*O*-palmitato + Luteína-3'-*O*-linoleato + Luteína-3-*O*-linoleato

⁶ Luteína diéster = Luteína-dipalmitato + Luteína-dilinoato + Luteína-palmitatolinoato

⁷ Luteína total = Luteína libre + Luteína monoéster + Luteína diéster

⁸ Carotenoides totales = 9'-*cis*-Neoxanteno + Violaxanteno + all-*trans*-Anteraxanteno + all-*trans*-Zeaxanteno + Luteína total + all-*trans*- β -Caroteno

⁹ Clorofilas totales = Clorofila *a* + Clorofila *b*

¹⁰ Relación ramas $\beta\epsilon/\beta\beta$ = (Luteína total)/(9'-*cis*-Neoxanteno + Violaxanteno + all-*trans*-Anteraxanteno + all-*trans*-Zeaxanteno + all-*trans*- β -Caroteno)

Tabla A12. Evolución del contenido de pigmentos individuales ($\mu\text{g/grano PS}$)¹ durante el desarrollo y maduración del grano de tritordeum (variedad HT335).

HT335	Estadio de desarrollo				
Carotenoide	E1	E2	E3	E4	EF
9'- <i>cis</i> -Neoxanteno	0.09 \pm 0.02 ^a	0.13 \pm 0.01 ^a	0.21 \pm 0.01 ^b	0.25 \pm 0.02 ^b	-
Violaxanteno ³	0.19 \pm 0.03 ^a	0.24 \pm 0.02 ^a	0.42 \pm 0.02 ^b	0.64 \pm 0.04 ^c	-
all- <i>trans</i> -Antheraxanteno	0.02 \pm 0.00 ^a	0.03 \pm 0.00 ^a	0.06 \pm 0.00 ^b	0.07 \pm 0.00 ^b	-
all- <i>trans</i> -Zeaxanteno	0.01 \pm 0.00 ^a	0.01 \pm 0.00 ^a	0.02 \pm 0.00 ^b	0.02 \pm 0.00 ^c	-
Luteína ⁴	0.25 \pm 0.05 ^a	0.35 \pm 0.03 ^a	0.63 \pm 0.03 ^b	0.93 \pm 0.08 ^c	0.22 \pm 0.01
all- <i>trans</i> - β -Caroteno	0.11 \pm 0.02 ^a	0.15 \pm 0.01 ^a	0.25 \pm 0.01 ^b	0.30 \pm 0.02 ^c	0.002 \pm 0.000
Luteína monoéster ⁵	-	-	-	-	0.08 \pm 0.00
Luteína diéster ⁶	-	-	-	-	0.01 \pm 0.00
Clorofila <i>a</i>	4.22 \pm 0.82 ^a	6.18 \pm 0.54 ^b	10.51 \pm 0.47 ^c	11.10 \pm 0.57 ^c	-
Clorofila <i>b</i>	1.31 \pm 0.27 ^a	2.06 \pm 0.19 ^b	3.49 \pm 0.15 ^c	3.63 \pm 0.12 ^c	-
Luteína total ⁷	0.25 \pm 0.05 ^a	0.35 \pm 0.03 ^a	0.63 \pm 0.03 ^b	0.93 \pm 0.08 ^c	0.31 \pm 0.01
Carotenoides totales ⁸	0.68 \pm 0.12 ^a	0.90 \pm 0.07 ^a	1.58 \pm 0.07 ^b	2.21 \pm 0.16 ^c	0.31 \pm 0.01
Clorofilas totales ⁹	5.53 \pm 1.09 ^a	8.24 \pm 0.73 ^b	14.00 \pm 0.62 ^c	14.73 \pm 0.69 ^c	-
Relación Cl <i>a</i> /Cl <i>b</i>	3.24 \pm 0.05 ^a	3.01 \pm 0.04 ^b	3.01 \pm 0.03 ^b	3.06 \pm 0.06 ^b	-
Relación Cl total/Car total	8.02 \pm 0.25 ^a	9.11 \pm 0.08 ^b	8.85 \pm 0.10 ^b	6.70 \pm 0.17 ^c	-
Relación ramas $\beta\epsilon/\beta\beta$ ¹⁰	0.59 \pm 0.02 ^a	0.62 \pm 0.01 ^{ab}	0.65 \pm 0.01 ^b	0.73 \pm 0.02 ^c	-

¹Los datos representan la media y el error estándar (n=4 para estadios E1-E4; n=8 para estadio EF). Letras superíndice diferentes para un mismo pigmento indican diferencias significativas ($p < 0.05$), determinadas por el test de Duncan, para el contenido en función del estadio de desarrollo.

²Estadios de desarrollo: E1 (8 DDA), E2 (14 DDA), E3 (18 DDA), E4 (25 DDA) y EF (30 DDA; maduro, harvest).

³Violaxanteno = all-*trans*-Violaxanteno + 9-*cis*-Violaxanteno + 13-*cis*-Violaxanteno

⁴Luteína = Luteína libre (all-*trans*-Luteína + 9-*cis*-Luteína + 13-*cis*-Luteína)

⁵Luteína monoéster = Luteína-3'-*O*-palmitato + Luteína-3-*O*-palmitato + Luteína-3'-*O*-linoleato + Luteína-3-*O*-linoleato

⁶Luteína diéster = Luteína-dipalmitato + Luteína-dilinoato + Luteína-palmitatolinoato

⁷Luteína total = Luteína libre + Luteína monoéster + Luteína diéster

⁸Carotenoides totales = 9'-*cis*-Neoxanteno + Violaxanteno + all-*trans*-Antheraxanteno + all-*trans*-Zeaxanteno + Luteína total + all-*trans*- β -Caroteno

⁹Clorofilas totales = Clorofila *a* + Clorofila *b*

¹⁰Relación ramas $\beta\epsilon/\beta\beta$ = (Luteína total)/(9'-*cis*-Neoxanteno + Violaxanteno + all-*trans*-Antheraxanteno + all-*trans*-Zeaxanteno + all-*trans*- β -Caroteno)

Tabla A13. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides totales ($\mu\text{g/g PF}$)¹ durante el almacenamiento en postrecolección de granos maduros de tritordeum y trigo duro.

Especia / Variedad	Contenido inicial (µg/g)	Temperatura (°C)	Tiempo de almacenamiento (días)		
			30	60	90
<i>Tritordeum</i>					
HT621	6.14 ± 0.23 ^a	4	5.34 ± 0.10 ^a	5.48 ± 0.62 ^a	5.46 ± 0.32 ^a
		20	5.61 ± 0.15 ^{ab}	4.98 ± 0.36 ^{ab}	5.17 ± 0.42 ^b
		37	4.92 ± 0.09 ^b	4.65 ± 0.14 ^b	4.55 ± 0.10 ^b
HT630	7.32 ± 0.13 ^a	4	6.98 ± 0.05 ^a	6.99 ± 0.20 ^a	7.08 ± 0.38 ^a
		20	6.53 ± 0.13 ^b	5.87 ± 0.15 ^b	6.43 ± 0.38 ^b
		37	5.51 ± 0.16 ^b	5.16 ± 0.18 ^b	5.26 ± 0.19 ^b
HT609	5.61 ± 0.24 ^a	4	5.49 ± 0.25 ^a	5.55 ± 0.27 ^a	4.92 ± 0.39 ^a
		20	5.21 ± 0.22 ^a	4.87 ± 0.16 ^a	5.25 ± 0.28 ^a
		37	4.77 ± 0.14 ^b	4.46 ± 0.02 ^b	4.38 ± 0.04 ^b
<i>Trigo duro</i>					
Don Pedro	0.87 ± 0.05 ^a	4	1.02 ± 0.07 ^a	1.04 ± 0.08 ^a	1.03 ± 0.11 ^a
		20	0.91 ± 0.06 ^a	0.84 ± 0.04 ^a	0.82 ± 0.06 ^a
		37	0.62 ± 0.02 ^b	0.60 ± 0.01 ^b	0.59 ± 0.02 ^b
Simeto	0.75 ± 0.05 ^a	4	1.05 ± 0.08 ^b	1.04 ± 0.06 ^b	0.98 ± 0.07 ^b
		20	0.79 ± 0.08 ^a	0.77 ± 0.05 ^a	0.75 ± 0.04 ^a
		37	0.58 ± 0.03 ^b	0.50 ± 0.02 ^b	0.50 ± 0.02 ^b
Claudio	0.60 ± 0.01 ^a	4	0.92 ± 0.06 ^b	1.00 ± 0.05 ^b	0.98 ± 0.04 ^b
		20	0.77 ± 0.07 ^b	0.75 ± 0.07 ^{ab}	0.72 ± 0.03 ^{ab}
		37	0.55 ± 0.02 ^b	0.50 ± 0.02 ^{bc}	0.48 ± 0.02 ^c

¹Los datos representan la media y el error estándar ($n=6$; tres bloques por duplicado). Letras superíndice diferentes para una misma temperatura de almacenamiento indican diferencias significativas (test de Duncan, $p<0.05$).

Tabla A14. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides individuales ($\mu\text{g/g PF}$)¹ durante el almacenamiento en postrecolección de granos maduros de trigo duro (variedad Don Pedro).

Don Pedro		Temperatura (°C)	Tiempo de almacenamiento (días)		
Carotenoide	Contenido inicial ($\mu\text{g/g}$)		30	60	90
<i>all-trans</i> -Luteína	0.62 ± 0.04^a	4	0.72 ± 0.06^a	0.75 ± 0.06^a	0.74 ± 0.09^a
		20	0.65 ± 0.04^a	0.59 ± 0.03^a	0.58 ± 0.05^a
		37	0.42 ± 0.02^b	0.40 ± 0.01^b	0.39 ± 0.01^b
<i>cis</i> -Luteína	0.12 ± 0.00^a	4	0.14 ± 0.01^a	0.15 ± 0.01^a	0.15 ± 0.02^a
		20	0.13 ± 0.01^a	0.13 ± 0.01^a	0.12 ± 0.01^a
		37	0.11 ± 0.00^b	0.10 ± 0.00^b	0.10 ± 0.00^b
<i>all-trans</i> -Zeaxanteno	0.10 ± 0.00^a	4	0.11 ± 0.01^a	0.11 ± 0.01^a	0.11 ± 0.01^a
		20	0.10 ± 0.01^a	0.09 ± 0.01^a	0.09 ± 0.01^a
		37	0.08 ± 0.00^b	0.07 ± 0.00^b	0.08 ± 0.00^b
<i>all-trans</i> - α -Caroteno	0.01 ± 0.00^a	4	0.01 ± 0.00^a	0.01 ± 0.00^a	0.01 ± 0.00^a
		20	0.01 ± 0.00^a	0.01 ± 0.00^a	0.01 ± 0.00^a
		37	0.01 ± 0.00^b	0.01 ± 0.00^b	0.01 ± 0.00^b
<i>all-trans</i> - β -Caroteno	0.02 ± 0.00^a	4	0.02 ± 0.00^a	0.02 ± 0.00^a	0.02 ± 0.00^a
		20	0.02 ± 0.00^a	0.02 ± 0.00^a	0.01 ± 0.00^a
		37	0.01 ± 0.00^b	0.01 ± 0.00^b	0.01 ± 0.00^b

¹Los datos representan la media y el error estándar (n=6; tres bloques por duplicado). Letras superíndice diferentes para una misma temperatura de almacenamiento indican diferencias significativas (test de Duncan, $p < 0.05$).

Tabla A15. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides individuales ($\mu\text{g/g PF}$)¹ durante el almacenamiento en postrecolección de granos maduros de trigo duro (variedad Simeto).

Simeto		Temperatura (°C)	Tiempo de almacenamiento (días)		
Carotenoide	Contenido inicial ($\mu\text{g/g}$)		30	60	90
all- <i>trans</i> -Luteína	0.54 ± 0.04^a	4	0.78 ± 0.06^b	0.78 ± 0.05^b	0.73 ± 0.06^b
		20	0.57 ± 0.06^a	0.56 ± 0.04^a	0.55 ± 0.03^a
		37	0.40 ± 0.02^b	0.34 ± 0.01^b	0.34 ± 0.02^b
<i>cis</i> -Luteína	0.11 ± 0.01^a	4	0.15 ± 0.01^b	0.15 ± 0.01^b	0.14 ± 0.01^b
		20	0.11 ± 0.01^a	0.11 ± 0.01^a	0.10 ± 0.01^a
		37	0.10 ± 0.00^a	0.09 ± 0.00^b	0.08 ± 0.00^b
all- <i>trans</i> -Zeaxanteno	0.08 ± 0.00^a	4	0.10 ± 0.01^b	0.10 ± 0.00^b	0.09 ± 0.00^b
		20	0.08 ± 0.01^a	0.08 ± 0.01^a	0.08 ± 0.00^a
		37	0.06 ± 0.00^b	0.06 ± 0.00^b	0.06 ± 0.00^b
all- <i>trans</i> - α -Caroteno	0.01 ± 0.00^a	4	0.01 ± 0.00^b	0.01 ± 0.00^{ab}	0.01 ± 0.00^{ab}
		20	0.01 ± 0.00^a	0.00 ± 0.00^a	0.00 ± 0.00^a
		37	0.00 ± 0.00^b	0.00 ± 0.00^b	0.00 ± 0.00^b
all- <i>trans</i> - β -Caroteno	0.01 ± 0.00^a	4	0.02 ± 0.00^b	0.02 ± 0.00^b	0.02 ± 0.00^b
		20	0.01 ± 0.00^a	0.01 ± 0.00^a	0.01 ± 0.00^a
		37	0.01 ± 0.00^b	0.01 ± 0.00^{ac}	0.01 ± 0.00^c

¹Los datos representan la media y el error estándar (n=6; tres bloques por duplicado). Letras superíndice diferentes para una misma temperatura de almacenamiento indican diferencias significativas (test de Duncan, $p < 0.05$).

Tabla A16. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides individuales ($\mu\text{g/g PF}$)¹ durante el almacenamiento en postrecolección de granos maduros de trigo duro (variedad Claudio).

Claudio		Temperatura (°C)	Tiempo de almacenamiento (días)		
Carotenoide	Contenido inicial ($\mu\text{g/g}$)		30	60	90
<i>all-trans</i> -Luteína	0.43 ± 0.01^a	4	0.68 ± 0.04^b	0.72 ± 0.03^b	0.71 ± 0.03^b
		20	0.55 ± 0.06^a	0.54 ± 0.05^a	0.52 ± 0.02^a
		37	0.37 ± 0.02^b	0.34 ± 0.02^{bc}	0.33 ± 0.01^c
<i>cis</i> -Luteína	0.09 ± 0.00^a	4	0.13 ± 0.01^b	0.15 ± 0.01^b	0.15 ± 0.01^b
		20	0.11 ± 0.01^b	0.11 ± 0.01^b	0.11 ± 0.01^{ab}
		37	0.09 ± 0.00^{ab}	0.10 ± 0.00^b	0.08 ± 0.00^a
<i>all-trans</i> -Zeaxanteno	0.06 ± 0.00^a	4	0.09 ± 0.00^b	0.10 ± 0.00^b	0.09 ± 0.00^b
		20	0.07 ± 0.01^b	0.07 ± 0.00^b	0.07 ± 0.00^{ab}
		37	0.06 ± 0.00^{ab}	0.05 ± 0.00^{bc}	0.05 ± 0.00^c
<i>all-trans</i> - α -Caroteno	0.01 ± 0.00^{ac}	4	0.01 ± 0.00^b	0.01 ± 0.00^b	0.02 ± 0.00^b
		20	0.01 ± 0.00^b	0.01 ± 0.00^a	0.01 ± 0.00^a
		37	0.01 ± 0.00^a	0.01 ± 0.00^{ac}	0.01 ± 0.00^c
<i>all-trans</i> - β -Caroteno	0.01 ± 0.00^{ac}	4	0.02 ± 0.00^b	0.02 ± 0.00^b	0.02 ± 0.00^b
		20	0.01 ± 0.00^b	0.01 ± 0.00^{ab}	0.01 ± 0.00^{ab}
		37	0.01 ± 0.00^a	0.01 ± 0.00^c	0.01 ± 0.00^c

¹Los datos representan la media y el error estándar (n=6; tres bloques por duplicado). Letras superíndice diferentes para una misma temperatura de almacenamiento indican diferencias significativas (test de Duncan, $p < 0.05$).

Tabla A17. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides individuales ($\mu\text{g/g PF}$)¹ durante el almacenamiento en postrecolección de granos maduros de tritordeum (variedad HT630).

HT630		Temperatura (°C)	Tiempo de almacenamiento (días)		
Carotenoide	Contenido inicial ($\mu\text{g/g}$)		30	60	90
all- <i>trans</i> -Luteína	5.12 ± 0.10^a	4	4.88 ± 0.06^a	4.77 ± 0.12^a	4.75 ± 0.26^a
		20	4.39 ± 0.07^b	3.75 ± 0.08^c	3.91 ± 0.33^{bc}
		37	2.92 ± 0.08^b	2.17 ± 0.09^c	1.95 ± 0.06^c
<i>cis</i> -Luteína	0.69 ± 0.01^a	4	0.68 ± 0.01^a	0.64 ± 0.02^a	0.69 ± 0.03^a
		20	0.64 ± 0.00^{ab}	0.56 ± 0.02^c	0.59 ± 0.04^{bc}
		37	0.59 ± 0.02^b	0.50 ± 0.02^c	0.47 ± 0.01^c
Luteína monolinoleato	0.49 ± 0.01^{ab}	4	0.47 ± 0.01^a	0.52 ± 0.02^{ab}	0.53 ± 0.03^b
		20	0.49 ± 0.02^a	0.52 ± 0.03^a	0.62 ± 0.01^b
		37	0.66 ± 0.03^c	0.78 ± 0.03^d	0.86 ± 0.04^d
Luteína 3'- <i>O</i> -linoleato	0.09 ± 0.00^a	4	0.08 ± 0.00^a	0.09 ± 0.00^a	0.09 ± 0.01^a
		20	0.09 ± 0.01^a	0.09 ± 0.00^a	0.11 ± 0.00^b
		37	0.12 ± 0.01^b	0.15 ± 0.01^c	0.17 ± 0.01^d
Luteína 3- <i>O</i> -linoleato	0.40 ± 0.01^{ab}	4	0.39 ± 0.01^a	0.43 ± 0.02^{ab}	0.44 ± 0.02^b
		20	0.40 ± 0.02^a	0.43 ± 0.02^a	0.51 ± 0.01^b
		37	0.54 ± 0.02^c	0.63 ± 0.02^d	0.69 ± 0.03^d
Luteína monopalmitato	0.81 ± 0.01^a	4	0.76 ± 0.03^a	0.84 ± 0.04^a	0.86 ± 0.05^a
		20	0.77 ± 0.03^a	0.79 ± 0.04^a	0.93 ± 0.01^b
		37	0.97 ± 0.03^b	1.05 ± 0.04^{bc}	1.12 ± 0.05^c
Luteína 3'- <i>O</i> -palmitato	0.24 ± 0.00^{ab}	4	0.23 ± 0.01^a	0.26 ± 0.01^{ab}	0.26 ± 0.01^b
		20	0.24 ± 0.01^a	0.24 ± 0.01^a	0.29 ± 0.01^b
		37	0.30 ± 0.01^c	0.33 ± 0.01^d	0.35 ± 0.01^d
Luteína 3- <i>O</i> -palmitato	0.57 ± 0.01^a	4	0.53 ± 0.02^a	0.58 ± 0.03^a	0.60 ± 0.03^a
		20	0.53 ± 0.02^a	0.54 ± 0.03^a	0.64 ± 0.01^b
		37	0.67 ± 0.02^b	0.72 ± 0.03^{bc}	0.77 ± 0.04^c
Luteína dilinoleato	0.02 ± 0.00^a	4	0.02 ± 0.00^a	0.02 ± 0.00^b	0.03 ± 0.00^c
		20	0.02 ± 0.00^{ab}	0.03 ± 0.01^b	0.05 ± 0.00^c
		37	0.05 ± 0.00^b	0.10 ± 0.00^c	0.14 ± 0.01^d
Luteína dipalmitato	0.05 ± 0.00^a	4	0.06 ± 0.00^a	0.07 ± 0.00^a	0.08 ± 0.00^b
		20	0.07 ± 0.00^a	0.08 ± 0.02^a	0.13 ± 0.00^b
		37	0.12 ± 0.00^b	0.22 ± 0.00^c	0.28 ± 0.01^d
Luteína linoleatopalmitato	0.05 ± 0.00^a	4	0.06 ± 0.00^{ab}	0.07 ± 0.00^b	0.08 ± 0.00^c
		20	0.07 ± 0.00^{ab}	0.09 ± 0.02^b	0.15 ± 0.00^c
		37	0.15 ± 0.00^b	0.28 ± 0.00^c	0.38 ± 0.02^d
all- <i>trans</i> - β -Caroteno	0.08 ± 0.00^a	4	0.07 ± 0.00^a	0.07 ± 0.00^a	0.07 ± 0.01^a
		20	0.06 ± 0.00^b	0.06 ± 0.00^b	0.06 ± 0.00^b
		37	0.06 ± 0.01^b	0.05 ± 0.00^b	0.06 ± 0.01^b

¹Los datos representan la media y el error estándar ($n=6$; tres bloques por duplicado). Letras superíndice diferentes para una misma temperatura de almacenamiento indican diferencias significativas (test de Duncan, $p<0.05$).

Tabla A18. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides individuales ($\mu\text{g/g PF}$)¹ durante el almacenamiento en postrecolección de granos maduros de tritordeum (variedad HT609).

HT609		Temperatura (°C)	Tiempo de almacenamiento (días)		
Carotenoide	Contenido inicial ($\mu\text{g/g}$)		30	60	90
all- <i>trans</i> -Luteína	4.06 ± 0.19^a	4	3.95 ± 0.15^a	3.97 ± 0.20^a	3.46 ± 0.30^a
		20	3.71 ± 0.18^{ab}	3.25 ± 0.10^b	3.42 ± 0.24^b
		37	2.70 ± 0.07^b	2.02 ± 0.04^c	1.77 ± 0.02^c
<i>cis</i> -Luteína	0.54 ± 0.02^a	4	0.54 ± 0.03^a	0.54 ± 0.03^a	0.45 ± 0.04^a
		20	0.52 ± 0.02^{ab}	0.46 ± 0.01^c	0.47 ± 0.02^{bc}
		37	0.53 ± 0.01^a	0.45 ± 0.01^b	0.41 ± 0.00^c
Luteína monolinoleato	0.26 ± 0.01^a	4	0.26 ± 0.01^a	0.27 ± 0.01^a	0.26 ± 0.01^a
		20	0.26 ± 0.01^a	0.31 ± 0.02^b	0.36 ± 0.01^c
		37	0.41 ± 0.01^a	0.53 ± 0.01^c	0.57 ± 0.01^d
Luteína 3'- <i>O</i> -linoleato	0.05 ± 0.00^a	4	0.05 ± 0.00^a	0.05 ± 0.00^a	0.05 ± 0.00^a
		20	0.05 ± 0.00^a	0.06 ± 0.00^b	0.07 ± 0.00^c
		37	0.08 ± 0.00^b	0.10 ± 0.00^c	0.12 ± 0.00^d
Luteína 3- <i>O</i> -linoleato	0.21 ± 0.01^a	4	0.21 ± 0.01^a	0.22 ± 0.01^a	0.21 ± 0.01^a
		20	0.20 ± 0.01^a	0.25 ± 0.01^b	0.29 ± 0.01^c
		37	0.33 ± 0.01^b	0.42 ± 0.01^c	0.46 ± 0.01^d
Luteína monopalmitato	0.62 ± 0.02^{ab}	4	0.61 ± 0.04^a	0.63 ± 0.03^a	0.61 ± 0.03^a
		20	0.59 ± 0.02^a	0.68 ± 0.04^b	0.78 ± 0.02^c
		37	0.88 ± 0.03^c	1.04 ± 0.01^d	1.09 ± 0.02^d
Luteína 3'- <i>O</i> -palmitato	0.18 ± 0.01^a	4	0.18 ± 0.01^a	0.19 ± 0.01^a	0.18 ± 0.01^a
		20	0.18 ± 0.01^a	0.21 ± 0.01^b	0.24 ± 0.01^c
		37	0.27 ± 0.01^b	0.33 ± 0.00^c	0.35 ± 0.01^c
Luteína 3- <i>O</i> -palmitato	0.44 ± 0.01^a	4	0.43 ± 0.02^a	0.44 ± 0.02^a	0.42 ± 0.02^a
		20	0.41 ± 0.01^a	0.47 ± 0.03^b	0.54 ± 0.01^c
		37	0.61 ± 0.02^b	0.71 ± 0.01^c	0.74 ± 0.02^c
Luteína dilinoleato	0.01 ± 0.00^a	4	0.01 ± 0.00^a	0.01 ± 0.00^a	0.01 ± 0.00^a
		20	0.01 ± 0.00^a	0.01 ± 0.00^b	0.01 ± 0.00^c
		37	0.01 ± 0.00^b	0.03 ± 0.00^c	0.04 ± 0.00^d
Luteína dipalmitato	0.03 ± 0.00^a	4	0.04 ± 0.00^a	0.04 ± 0.00^b	0.05 ± 0.00^b
		20	0.04 ± 0.00^{ab}	0.06 ± 0.01^b	0.09 ± 0.00^c
		37	0.10 ± 0.01^b	0.18 ± 0.00^c	0.23 ± 0.00^d
Luteína linoleatopalmitato	0.02 ± 0.00^a	4	0.03 ± 0.00^a	0.03 ± 0.00^a	0.03 ± 0.00^a
		20	0.03 ± 0.00^a	0.04 ± 0.01^b	0.06 ± 0.00^c
		37	0.07 ± 0.00^b	0.16 ± 0.00^c	0.21 ± 0.00^d
all- <i>trans</i> - β -Caroteno	0.07 ± 0.00^a	4	0.06 ± 0.01^a	0.06 ± 0.00^a	0.06 ± 0.01^a
		20	0.05 ± 0.00^{ab}	0.05 ± 0.00^b	0.06 ± 0.00^b
		37	0.06 ± 0.00^b	0.06 ± 0.00^b	0.06 ± 0.00^b

¹Los datos representan la media y el error estándar (n=6; tres bloques por duplicado). Letras superíndice diferentes para una misma temperatura de almacenamiento indican diferencias significativas (test de Duncan, $p < 0.05$).

Tabla A19. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides individuales ($\mu\text{g/g PF}$)¹ durante el almacenamiento en postrecolección de granos maduros de tritordeum (variedad HT621).

HT621		Temperatura (°C)	Tiempo de almacenamiento (días)		
Carotenoide	Contenido inicial ($\mu\text{g/g}$)		30	60	90
all- <i>trans</i> -Luteína	4.72 ± 0.17^a	4	4.08 ± 0.07^a	4.13 ± 0.44^a	4.09 ± 0.20^a
		20	4.20 ± 0.13^{ab}	3.56 ± 0.27^b	3.58 ± 0.32^b
		37	3.08 ± 0.06^b	2.46 ± 0.08^c	2.18 ± 0.04^c
<i>cis</i> -Luteína	0.64 ± 0.02^a	4	0.59 ± 0.02^a	0.55 ± 0.05^a	0.57 ± 0.03^a
		20	0.61 ± 0.01^a	0.52 ± 0.03^b	0.54 ± 0.02^b
		37	0.63 ± 0.02^b	0.55 ± 0.01^c	0.51 ± 0.01^c
Luteína monolinoleato	0.20 ± 0.01^a	4	0.18 ± 0.00^a	0.21 ± 0.03^a	0.21 ± 0.02^a
		20	0.21 ± 0.01^a	0.24 ± 0.02^{ab}	0.28 ± 0.03^b
		37	0.32 ± 0.00^b	0.45 ± 0.02^c	0.52 ± 0.02^d
Luteína 3'- <i>O</i> -linoleato	0.04 ± 0.00^a	4	0.04 ± 0.00^a	0.04 ± 0.01^a	0.04 ± 0.00^a
		20	0.04 ± 0.00^a	0.05 ± 0.00^{ab}	0.06 ± 0.01^b
		37	0.07 ± 0.00^b	0.10 ± 0.00^c	0.11 ± 0.00^d
Luteína 3- <i>O</i> -linoleato	0.16 ± 0.01^a	4	0.14 ± 0.00^a	0.17 ± 0.03^a	0.17 ± 0.02^a
		20	0.17 ± 0.01^a	0.19 ± 0.01^{ab}	0.22 ± 0.02^b
		37	0.26 ± 0.00^b	0.36 ± 0.01^c	0.40 ± 0.02^d
Luteína monopalmitato	0.49 ± 0.02^a	4	0.42 ± 0.01^a	0.50 ± 0.08^a	0.50 ± 0.06^a
		20	0.50 ± 0.02^a	0.55 ± 0.03^{ab}	0.63 ± 0.05^b
		37	0.73 ± 0.01^b	0.93 ± 0.03^c	0.99 ± 0.04^c
Luteína 3'- <i>O</i> -palmitato	0.15 ± 0.01^a	4	0.13 ± 0.00^a	0.16 ± 0.03^a	0.16 ± 0.02^a
		20	0.16 ± 0.01^a	0.18 ± 0.01^{ab}	0.21 ± 0.02^b
		37	0.24 ± 0.00^b	0.32 ± 0.01^c	0.34 ± 0.01^c
Luteína 3- <i>O</i> -palmitato	0.34 ± 0.01^a	4	0.29 ± 0.01^a	0.34 ± 0.05^a	0.34 ± 0.04^a
		20	0.34 ± 0.01^a	0.37 ± 0.02^{ab}	0.42 ± 0.03^b
		37	0.49 ± 0.01^b	0.61 ± 0.02^c	0.65 ± 0.02^c
Luteína dilinoleato	0.00 ± 0.00^a	4	0.00 ± 0.00^a	0.00 ± 0.00^a	0.00 ± 0.00^a
		20	0.00 ± 0.00^a	0.00 ± 0.00^a	0.01 ± 0.00^b
		37	0.01 ± 0.00^b	0.02 ± 0.00^c	0.02 ± 0.00^d
Luteína dipalmitato	0.02 ± 0.00^a	4	0.02 ± 0.00^a	0.02 ± 0.00^{ab}	0.03 ± 0.00^b
		20	0.02 ± 0.00^a	0.04 ± 0.00^b	0.05 ± 0.01^c
		37	0.06 ± 0.00^b	0.11 ± 0.01^c	0.14 ± 0.01^d
Luteína linoleatopalmitato	0.01 ± 0.00^a	4	0.01 ± 0.00^a	0.01 ± 0.00^{ab}	0.02 ± 0.00^b
		20	0.02 ± 0.00^a	0.03 ± 0.00^b	0.04 ± 0.00^c
		37	0.04 ± 0.00^b	0.09 ± 0.00^c	0.13 ± 0.01^d
all- <i>trans</i> - β -Caroteno	0.06 ± 0.00^a	4	0.05 ± 0.00^b	0.05 ± 0.00^b	0.04 ± 0.01^b
		20	0.05 ± 0.00^b	0.04 ± 0.00^b	0.04 ± 0.00^b
		37	0.05 ± 0.00^b	0.05 ± 0.00^b	0.05 ± 0.00^b

¹Los datos representan la media y el error estándar (n=6; tres bloques por duplicado). Letras superíndice diferentes para una misma temperatura de almacenamiento indican diferencias significativas (test de Duncan, $p < 0.05$).

Tabla A20. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides totales ($\mu\text{g/g PF}$)¹ durante el almacenamiento corto (3 meses) de harinas integrales preparadas con granos maduros de tritordeum y trigo duro.

Especie / Variedad	Contenido inicial (µg/g)	Temperatura (°C)	Tiempo de almacenamiento (días)		
			30	60	90
<i>Tritordeum</i>					
HT621	10.23 ± 0.28 ^a	4	8.53 ± 0.78 ^b	5.80 ± 0.07 ^c	4.84 ± 0.24 ^c
		20	6.56 ± 0.01 ^b	4.94 ± 0.04 ^c	5.50 ± 0.10 ^c
		37	6.32 ± 0.24 ^b	4.53 ± 0.04 ^c	4.39 ± 0.15 ^c
		50	5.09 ± 0.08 ^b	2.86 ± 0.19 ^c	2.43 ± 0.07 ^c
HT630	12.13 ± 0.13 ^a	4	9.63 ± 0.32 ^b	7.18 ± 0.10 ^c	6.42 ± 0.08 ^d
		20	7.74 ± 0.00 ^b	6.26 ± 0.09 ^c	6.36 ± 0.28 ^c
		37	7.23 ± 0.05 ^b	5.63 ± 0.08 ^c	4.91 ± 0.13 ^d
		50	5.18 ± 0.27 ^b	3.09 ± 0.07 ^c	2.02 ± 0.01 ^d
HT609	9.97 ± 0.27 ^a	4	7.85 ± 0.10 ^b	5.95 ± 0.24 ^c	5.17 ± 0.08 ^c
		20	6.25 ± 0.18 ^b	5.48 ± 0.06 ^{bc}	5.09 ± 0.19 ^c
		37	6.14 ± 0.11 ^b	4.63 ± 0.09 ^c	4.44 ± 0.15 ^c
		50	6.12 ± 0.63 ^b	3.24 ± 0.02 ^c	2.26 ± 0.14 ^c
<i>Trigo duro</i>					
Don Pedro	1.45 ± 0.07 ^a	4	1.22 ± 0.02 ^a	0.96 ± 0.06 ^b	0.75 ± 0.02 ^b
		20	0.66 ± 0.13 ^b	0.71 ± 0.01 ^b	0.63 ± 0.04 ^b
		37	0.72 ± 0.07 ^b	0.47 ± 0.03 ^c	0.36 ± 0.04 ^c
		50	0.48 ± 0.02 ^b	0.17 ± 0.01 ^c	0.12 ± 0.00 ^c
Simeto	1.09 ± 0.07 ^a	4	1.04 ± 0.03 ^a	0.70 ± 0.01 ^b	0.60 ± 0.04 ^b
		20	0.52 ± 0.04 ^b	0.49 ± 0.05 ^b	0.48 ± 0.01 ^b
		37	0.50 ± 0.01 ^b	0.31 ± 0.00 ^{bc}	0.24 ± 0.01 ^c
		50	0.25 ± 0.01 ^b	0.10 ± 0.01 ^b	0.03 ± 0.00 ^b
Claudio	1.27 ± 0.03 ^a	4	1.04 ± 0.02 ^b	0.76 ± 0.03 ^c	0.63 ± 0.01 ^d
		20	0.97 ± 0.12 ^b	0.66 ± 0.02 ^c	0.65 ± 0.01 ^c
		37	0.70 ± 0.02 ^b	0.41 ± 0.02 ^c	0.29 ± 0.01 ^d
		50	0.39 ± 0.02 ^b	0.17 ± 0.01 ^c	0.05 ± 0.01 ^d

¹ Los datos representan la media y el error estándar ($n=4$ para el control; $n=2$ para resto de muestras). Letras superíndice diferentes para una misma temperatura de almacenamiento indican diferencias significativas (test de Duncan, $p<0.05$).

Tabla A21. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides individuales ($\mu\text{g/g PF}$)¹ durante el almacenamiento corto (3 meses) de harinas integrales preparadas con granos maduros de trigo duro (variedad Don Pedro).

Don Pedro		Temperatura (°C)	Tiempo de almacenamiento (días)		
Carotenoide	Contenido inicial ($\mu\text{g/g}$)		30	60	90
all- <i>trans</i> -Luteína	1.00 ± 0.05^a	4	0.82 ± 0.02^b	0.65 ± 0.04^{bc}	0.51 ± 0.01^c
		20	0.45 ± 0.09^b	0.47 ± 0.01^b	0.43 ± 0.03^b
		37	0.45 ± 0.04^b	0.30 ± 0.02^{bc}	0.22 ± 0.02^c
		50	0.27 ± 0.01^b	0.10 ± 0.01^c	0.07 ± 0.00^c
<i>cis</i> -Luteína	0.20 ± 0.01^a	4	0.17 ± 0.00^a	0.13 ± 0.01^b	0.11 ± 0.00^b
		20	0.10 ± 0.02^b	0.12 ± 0.00^b	0.11 ± 0.01^b
		37	0.15 ± 0.02^b	0.10 ± 0.01^c	0.08 ± 0.01^c
		50	0.13 ± 0.00^b	0.04 ± 0.00^c	0.03 ± 0.00^c
all- <i>trans</i> -Zeaxanteno	0.20 ± 0.01^a	4	0.18 ± 0.00^a	0.13 ± 0.01^b	0.10 ± 0.00^c
		20	0.08 ± 0.02^b	0.08 ± 0.00^b	0.07 ± 0.01^b
		37	0.08 ± 0.01^b	0.05 ± 0.01^c	0.03 ± 0.01^c
		50	0.05 ± 0.00^b	0.02 ± 0.00^c	0.01 ± 0.00^c
all- <i>trans</i> - α -Caroteno	0.01 ± 0.00^a	4	0.01 ± 0.00^b	0.01 ± 0.00^c	0.01 ± 0.00^d
		20	0.01 ± 0.00^b	0.01 ± 0.00^b	0.01 ± 0.00^b
		37	0.01 ± 0.00^b	0.01 ± 0.00^b	0.01 ± 0.00^c
		50	0.01 ± 0.00^a	0.01 ± 0.00^b	0.00 ± 0.00^c
all- <i>trans</i> - β -Caroteno	0.03 ± 0.00^a	4	0.04 ± 0.00^b	0.03 ± 0.00^a	0.02 ± 0.00^c
		20	0.02 ± 0.00^{bc}	0.02 ± 0.00^b	0.01 ± 0.00^c
		37	0.02 ± 0.00^b	0.02 ± 0.00^b	0.01 ± 0.00^c
		50	0.02 ± 0.00^b	0.01 ± 0.00^c	0.00 ± 0.00^d

¹Los datos representan la media y el error estándar (n=4 para el control; n=2 para resto de muestras). Letras superíndice diferentes para una misma temperatura de almacenamiento indican diferencias significativas (test de Duncan, $p < 0.05$).

Tabla A22. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides individuales ($\mu\text{g/g PF}$)¹ durante el almacenamiento corto (3 meses) de harinas integrales preparadas con granos maduros de trigo duro (variedad Simeto).

Simeto		Temperatura (°C)	Tiempo de almacenamiento (días)		
Carotenoide	Contenido inicial ($\mu\text{g/g}$)		30	60	90
<i>all-trans</i> -Luteína	0.78 ± 0.05^a	4	0.72 ± 0.01^a	0.50 ± 0.01^b	0.43 ± 0.03^b
		20	0.37 ± 0.03^b	0.34 ± 0.03^b	0.34 ± 0.01^b
		37	0.33 ± 0.01^b	0.21 ± 0.00^{bc}	0.16 ± 0.01^c
		50	0.15 ± 0.01^b	0.06 ± 0.00^b	0.02 ± 0.00^b
<i>cis</i> -Luteína	0.14 ± 0.01^a	4	0.14 ± 0.01^a	0.09 ± 0.00^b	0.08 ± 0.00^b
		20	0.07 ± 0.01^b	0.07 ± 0.01^b	0.07 ± 0.00^b
		37	0.10 ± 0.00^b	0.06 ± 0.00^c	0.05 ± 0.00^c
		50	0.06 ± 0.00^b	0.02 ± 0.00^c	0.01 ± 0.00^c
<i>all-trans</i> -Zeaxanteno	0.14 ± 0.01^a	4	0.14 ± 0.00^a	0.08 ± 0.00^b	0.07 ± 0.00^b
		20	0.06 ± 0.00^b	0.05 ± 0.01^b	0.05 ± 0.00^b
		37	0.06 ± 0.00^b	0.03 ± 0.00^b	0.02 ± 0.00^b
		50	0.02 ± 0.00^b	0.01 ± 0.00^b	0.00 ± 0.00^b
<i>all-trans</i> - α -Caroteno	0.01 ± 0.00^a	4	0.01 ± 0.00^a	0.01 ± 0.00^b	0.00 ± 0.00^b
		20	0.00 ± 0.00^b	0.00 ± 0.00^b	0.00 ± 0.00^b
		37	0.00 ± 0.00^b	0.01 ± 0.00^{ab}	0.00 ± 0.00^b
		50	0.01 ± 0.00^b	0.00 ± 0.00^c	0.00 ± 0.00^d
<i>all-trans</i> - β -Caroteno	0.02 ± 0.00^a	4	0.03 ± 0.00^b	0.02 ± 0.00^a	0.01 ± 0.00^c
		20	0.01 ± 0.00^b	0.01 ± 0.00^b	0.01 ± 0.00^b
		37	0.01 ± 0.00^b	0.01 ± 0.00^{bc}	0.01 ± 0.00^c
		50	0.01 ± 0.00^b	0.00 ± 0.00^c	0.00 ± 0.00^c

¹Los datos representan la media y el error estándar (n=4 para el control; n=2 para resto de muestras). Letras superíndice diferentes para una misma temperatura de almacenamiento indican diferencias significativas (test de Duncan, $p < 0.05$).

Tabla A23. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides individuales ($\mu\text{g/g PF}$)¹ durante el almacenamiento corto (3 meses) de harinas integrales preparadas con granos maduros de trigo duro (variedad Claudio).

Claudio		Temperatura (°C)	Tiempo de almacenamiento (días)		
Carotenoide	Contenido inicial ($\mu\text{g/g}$)		30	60	90
all- <i>trans</i> -Luteína	0.89 ± 0.02^a	4	0.71 ± 0.01^b	0.52 ± 0.02^c	0.44 ± 0.01^d
		20	0.67 ± 0.08^b	0.45 ± 0.02^c	0.45 ± 0.01^c
		37	0.45 ± 0.02^b	0.26 ± 0.01^c	0.18 ± 0.01^d
		50	0.23 ± 0.01^b	0.10 ± 0.00^c	0.03 ± 0.00^c
<i>cis</i> -Luteína	0.17 ± 0.00^a	4	0.15 ± 0.00^b	0.10 ± 0.00^c	0.09 ± 0.00^d
		20	0.14 ± 0.02^a	0.10 ± 0.00^b	0.10 ± 0.00^b
		37	0.14 ± 0.00^b	0.09 ± 0.00^c	0.07 ± 0.00^d
		50	0.10 ± 0.01^b	0.04 ± 0.00^c	0.01 ± 0.00^d
all- <i>trans</i> -Zeaxanteno	0.17 ± 0.00^a	4	0.14 ± 0.00^b	0.09 ± 0.00^c	0.08 ± 0.00^d
		20	0.12 ± 0.01^b	0.08 ± 0.01^c	0.08 ± 0.00^c
		37	0.07 ± 0.00^b	0.04 ± 0.00^c	0.03 ± 0.00^d
		50	0.04 ± 0.00^b	0.01 ± 0.00^c	0.00 ± 0.00^c
all- <i>trans</i> - α -Caroteno	0.02 ± 0.00^a	4	0.01 ± 0.00^b	0.01 ± 0.00^c	0.01 ± 0.00^d
		20	0.02 ± 0.00^a	0.01 ± 0.00^b	0.01 ± 0.00^b
		37	0.02 ± 0.00^b	0.01 ± 0.00^c	0.01 ± 0.00^d
		50	0.01 ± 0.00^b	0.01 ± 0.00^c	0.00 ± 0.00^d
all- <i>trans</i> - β -Caroteno	0.03 ± 0.00^a	4	0.03 ± 0.00^b	0.02 ± 0.00^c	0.01 ± 0.00^d
		20	0.03 ± 0.00^a	0.02 ± 0.00^b	0.02 ± 0.00^b
		37	0.02 ± 0.00^b	0.01 ± 0.00^c	0.01 ± 0.00^d
		50	0.01 ± 0.00^b	0.01 ± 0.00^c	0.00 ± 0.00^d

¹Los datos representan la media y el error estándar (n=4 para el control; n=2 para resto de muestras). Letras superíndice diferentes para una misma temperatura de almacenamiento indican diferencias significativas (test de Duncan, $p < 0.05$).

Tabla A24. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides individuales ($\mu\text{g/g PF}$)¹ durante el almacenamiento corto (3 meses) de harinas integrales preparadas con granos maduros de tritordeum (variedad HT630).

HT630		Temperatura (°C)	Tiempo de almacenamiento (días)		
Carotenoide	Contenido inicial ($\mu\text{g/g}$)		30	60	90
<i>all-trans</i> -Luteína	7.98 ± 0.09^a	4	6.04 ± 0.22^b	4.33 ± 0.06^c	4.03 ± 0.07^c
		20	4.78 ± 0.03^b	3.51 ± 0.05^c	3.57 ± 0.19^c
		37	3.67 ± 0.01^b	2.29 ± 0.01^c	1.86 ± 0.08^d
		50	1.93 ± 0.08^b	0.87 ± 0.02^c	0.45 ± 0.01^d
<i>cis</i> -Luteína	1.03 ± 0.01^a	4	0.84 ± 0.03^b	0.60 ± 0.01^c	0.53 ± 0.00^d
		20	0.68 ± 0.01^b	0.56 ± 0.00^c	0.60 ± 0.00^d
		37	0.90 ± 0.01^b	0.67 ± 0.00^c	0.58 ± 0.02^d
		50	0.71 ± 0.05^b	0.33 ± 0.01^c	0.17 ± 0.00^d
Luteína monolinoleato	1.02 ± 0.01^a	4	0.85 ± 0.03^b	0.70 ± 0.01^c	0.62 ± 0.01^d
		20	0.73 ± 0.00^b	0.73 ± 0.01^b	0.78 ± 0.04^b
		37	0.95 ± 0.03^a	1.00 ± 0.05^a	0.93 ± 0.00^a
		50	0.95 ± 0.05^a	0.69 ± 0.04^b	0.50 ± 0.00^c
Luteína 3'- <i>O</i> -linoleato	0.18 ± 0.00^a	4	0.16 ± 0.01^b	0.12 ± 0.00^c	0.10 ± 0.00^d
		20	0.15 ± 0.00^b	0.14 ± 0.01^c	0.16 ± 0.01^b
		37	0.28 ± 0.02^b	0.28 ± 0.03^b	0.27 ± 0.01^b
		50	0.34 ± 0.02^b	0.21 ± 0.02^a	0.18 ± 0.01^a
Luteína 3- <i>O</i> -linoleato	0.84 ± 0.01^a	4	0.69 ± 0.02^b	0.59 ± 0.01^c	0.52 ± 0.01^d
		20	0.57 ± 0.00^b	0.59 ± 0.01^b	0.62 ± 0.03^b
		37	0.67 ± 0.01^b	0.72 ± 0.02^c	0.66 ± 0.01^b
		50	0.61 ± 0.03^b	0.48 ± 0.02^c	0.33 ± 0.01^d
Luteína monopalmitato	1.56 ± 0.02^a	4	1.40 ± 0.04^b	1.12 ± 0.02^c	0.91 ± 0.01^d
		20	1.15 ± 0.00^b	1.03 ± 0.02^c	1.00 ± 0.04^c
		37	1.23 ± 0.02^b	1.09 ± 0.01^c	0.93 ± 0.04^d
		50	1.00 ± 0.09^b	0.68 ± 0.00^c	0.43 ± 0.01^d
Luteína 3'- <i>O</i> -palmitato	0.48 ± 0.00^a	4	0.45 ± 0.01^b	0.33 ± 0.00^c	0.26 ± 0.01^d
		20	0.38 ± 0.00^b	0.30 ± 0.01^c	0.30 ± 0.01^c
		37	0.45 ± 0.02^a	0.37 ± 0.02^b	0.33 ± 0.00^b
		50	0.41 ± 0.04^b	0.26 ± 0.01^c	0.19 ± 0.00^d
Luteína 3- <i>O</i> -palmitato	1.07 ± 0.01^a	4	0.95 ± 0.03^b	0.79 ± 0.01^c	0.65 ± 0.00^d
		20	0.76 ± 0.01^b	0.73 ± 0.01^{bc}	0.70 ± 0.03^c
		37	0.77 ± 0.00^b	0.72 ± 0.01^b	0.59 ± 0.04^c
		50	0.59 ± 0.05^b	0.41 ± 0.00^c	0.24 ± 0.01^d
Luteína dilinoleato	0.05 ± 0.00^a	4	0.05 ± 0.00^b	0.04 ± 0.00^c	0.03 ± 0.00^d
		20	0.03 ± 0.00^b	0.05 ± 0.00^a	0.06 ± 0.00^c
		37	0.07 ± 0.00^a	0.11 ± 0.01^b	0.16 ± 0.02^c
		50	0.15 ± 0.00^b	0.14 ± 0.02^b	0.17 ± 0.01^b
Luteína dipalmitato	0.20 ± 0.00^a	4	0.17 ± 0.00^b	0.14 ± 0.00^c	0.12 ± 0.00^d
		20	0.13 ± 0.00^b	0.15 ± 0.00^b	0.13 ± 0.00^c
		37	0.14 ± 0.00^b	0.16 ± 0.00^c	0.15 ± 0.00^d
		50	0.15 ± 0.01^b	0.12 ± 0.00^c	0.09 ± 0.00^d

Luteína linoleatopalmitato	0.21 ± 0.00^a	4	0.18 ± 0.00^b	0.15 ± 0.00^c	0.14 ± 0.01^d
		20	0.15 ± 0.01^b	0.17 ± 0.00^{bc}	0.17 ± 0.01^c
		37	0.21 ± 0.00^a	0.25 ± 0.01^b	0.28 ± 0.00^c
		50	0.25 ± 0.01^b	0.23 ± 0.02^{ab}	0.21 ± 0.01^a
all- <i>trans</i> -β-Caroteno	0.08 ± 0.00^a	4	0.09 ± 0.00^b	0.09 ± 0.00^b	0.05 ± 0.00^c
		20	0.08 ± 0.00^a	0.07 ± 0.00^b	0.05 ± 0.00^c
		37	0.07 ± 0.00^b	0.06 ± 0.00^c	0.03 ± 0.01^d
		50	0.05 ± 0.00^b	0.02 ± 0.01^c	0.01 ± 0.00^d

¹Los datos representan la media y el error estándar (n=4 para el control; n=2 para resto de muestras). Letras superíndice diferentes para una misma temperatura de almacenamiento indican diferencias significativas (test de Duncan, $p < 0.05$).

Tabla A25. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides individuales ($\mu\text{g/g PF}$)¹ durante el almacenamiento corto (3 meses) de harinas integrales preparadas con granos maduros de tritordeum (variedad HT609).

HT609		Temperatura (°C)	Tiempo de almacenamiento (días)		
Carotenoide	Contenido inicial ($\mu\text{g/g}$)		30	60	90
all- <i>trans</i> -Luteína	7.00 ± 0.20^a	4	5.29 ± 0.07^b	3.91 ± 0.18^c	3.52 ± 0.06^c
		20	4.18 ± 0.12^b	3.40 ± 0.04^c	3.12 ± 0.13^c
		37	3.37 ± 0.06^b	2.12 ± 0.08^c	1.87 ± 0.08^c
		50	2.53 ± 0.35^b	1.08 ± 0.03^c	0.63 ± 0.08^c
<i>cis</i> -Luteína	0.89 ± 0.02^a	4	0.73 ± 0.01^b	0.53 ± 0.01^c	0.45 ± 0.00^d
		20	0.55 ± 0.02^b	0.51 ± 0.00^b	0.52 ± 0.00^b
		37	0.83 ± 0.03^a	0.63 ± 0.04^b	0.59 ± 0.02^b
		50	0.90 ± 0.09^a	0.46 ± 0.01^b	0.25 ± 0.04^c
Luteína monolinoleato	0.54 ± 0.01^a	4	0.45 ± 0.01^b	0.40 ± 0.02^c	0.31 ± 0.00^d
		20	0.40 ± 0.01^b	0.47 ± 0.01^c	0.46 ± 0.01^c
		37	0.63 ± 0.00^b	0.67 ± 0.03^b	0.75 ± 0.00^c
		50	1.02 ± 0.08^b	0.62 ± 0.02^a	0.51 ± 0.01^a
Luteína 3'- <i>O</i> -linoleato	0.10 ± 0.00^a	4	0.10 ± 0.00^a	0.07 ± 0.00^b	0.04 ± 0.00^c
		20	0.09 ± 0.00^a	0.10 ± 0.00^a	0.10 ± 0.00^a
		37	0.20 ± 0.01^b	0.18 ± 0.01^b	0.23 ± 0.01^c
		50	0.43 ± 0.05^b	0.19 ± 0.01^c	0.17 ± 0.00^c
Luteína 3- <i>O</i> -linoleato	0.44 ± 0.01^a	4	0.35 ± 0.00^b	0.32 ± 0.01^b	0.27 ± 0.00^c
		20	0.31 ± 0.01^b	0.37 ± 0.00^c	0.36 ± 0.01^c
		ab37	0.43 ± 0.00^a	0.48 ± 0.02^{bc}	0.52 ± 0.01^c
		50	0.58 ± 0.03^b	0.43 ± 0.01^a	0.33 ± 0.01^c
Luteína monopalmitato	1.23 ± 0.03^a	4	1.10 ± 0.01^b	0.89 ± 0.03^c	0.71 ± 0.02^d
		20	0.89 ± 0.03^b	0.88 ± 0.01^{bc}	0.78 ± 0.02^c
		37	1.04 ± 0.02^b	0.90 ± 0.02^c	0.87 ± 0.04^c
		50	1.22 ± 0.10^a	0.73 ± 0.01^b	0.52 ± 0.04^c
Luteína 3'- <i>O</i> -palmitato	0.38 ± 0.01^a	4	0.34 ± 0.00^b	0.25 ± 0.01^c	0.20 ± 0.01^d
		20	0.30 ± 0.01^b	0.25 ± 0.00^c	0.23 ± 0.00^c
		37	0.38 ± 0.01^a	0.29 ± 0.01^b	0.31 ± 0.01^b
		50	0.51 ± 0.06^b	0.26 ± 0.01^c	0.21 ± 0.01^c
Luteína 3- <i>O</i> -palmitato	0.86 ± 0.02^a	4	0.76 ± 0.00^b	0.64 ± 0.02^c	0.51 ± 0.01^d
		20	0.60 ± 0.02^b	0.63 ± 0.01^b	0.55 ± 0.02^b
		37	0.66 ± 0.01^b	0.61 ± 0.01^{bc}	0.55 ± 0.03^c
		50	0.71 ± 0.05^b	0.47 ± 0.00^c	0.31 ± 0.03^d
Luteína dilinoleato	0.01 ± 0.00^a	4	0.01 ± 0.00^b	0.01 ± 0.00^b	0.01 ± 0.00^b
		20	0.01 ± 0.00^a	0.01 ± 0.00^b	0.02 ± 0.00^c
		37	0.02 ± 0.00^a	0.04 ± 0.01^b	0.07 ± 0.01^c
		50	0.09 ± 0.00^{bc}	0.06 ± 0.01^b	0.09 ± 0.02^c
Luteína dipalmitato	0.12 ± 0.00^a	4	0.10 ± 0.00^b	0.08 ± 0.00^c	0.07 ± 0.00^d
		20	0.07 ± 0.00^b	0.08 ± 0.00^c	0.07 ± 0.00^{bc}
		37	0.08 ± 0.00^b	0.10 ± 0.00^c	0.10 ± 0.00^c
		50	0.12 ± 0.00^a	0.10 ± 0.00^b	0.08 ± 0.00^c

Luteína linoleatopalmitato	0.08 ± 0.00^a	4	0.06 ± 0.00^b	0.06 ± 0.00^{bc}	0.05 ± 0.00^c
		20	0.05 ± 0.00^b	0.07 ± 0.00^c	0.07 ± 0.00^c
		37	0.09 ± 0.00^a	0.12 ± 0.01^b	0.15 ± 0.00^c
		50	0.18 ± 0.00^b	0.16 ± 0.01^b	0.17 ± 0.01^b
all- <i>trans</i> -β-Caroteno	0.10 ± 0.00^a	4	0.11 ± 0.00^a	0.08 ± 0.00^b	0.05 ± 0.00^c
		20	0.09 ± 0.00^a	0.06 ± 0.00^b	0.05 ± 0.01^b
		37	0.08 ± 0.00^b	0.05 ± 0.00^c	0.04 ± 0.00^c
		50	0.07 ± 0.01^b	0.02 ± 0.00^c	0.01 ± 0.00^c

¹Los datos representan la media y el error estándar (n=4 para el control; n=2 para resto de muestras). Letras superíndice diferentes para una misma temperatura de almacenamiento indican diferencias significativas (test de Duncan, $p < 0.05$).

Tabla A26. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides individuales ($\mu\text{g/g PF}$)¹ durante el almacenamiento corto (3 meses) de harinas integrales preparadas con granos maduros de tritordeum (variedad HT621).

HT621		Tiempo de almacenamiento (días)			
Carotenoide	Contenido inicial ($\mu\text{g/g}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	30	60	90
all- <i>trans</i> -Luteína	7.60 ± 0.22^a	4	6.10 ± 0.56^b	4.09 ± 0.06^c	3.47 ± 0.18^c
		20	4.60 ± 0.01^b	3.23 ± 0.00^c	3.13 ± 0.01^c
		37	3.67 ± 0.11^b	2.29 ± 0.05^c	1.98 ± 0.00^c
		50	2.21 ± 0.03^b	0.87 ± 0.00^c	0.82 ± 0.04^c
<i>cis</i> -Luteína	0.97 ± 0.02^a	4	0.84 ± 0.07^b	0.54 ± 0.00^c	0.47 ± 0.03^c
		20	0.66 ± 0.01^b	0.53 ± 0.03^c	0.53 ± 0.00^c
		37	0.97 ± 0.01^a	0.71 ± 0.00^b	0.62 ± 0.01^c
		50	0.84 ± 0.02^b	0.35 ± 0.01^c	0.34 ± 0.01^c
Luteína monolinoleato	0.44 ± 0.01^a	4	0.39 ± 0.04^a	0.31 ± 0.00^b	0.26 ± 0.01^b
		20	0.35 ± 0.00^b	0.37 ± 0.00^c	0.75 ± 0.05^c
		37	0.56 ± 0.06^a	0.56 ± 0.00^a	0.73 ± 0.07^b
		50	0.81 ± 0.07^b	0.65 ± 0.05^c	0.51 ± 0.01^a
Luteína 3'- <i>O</i> -linoleato	0.08 ± 0.00^a	4	0.09 ± 0.01^a	0.07 ± 0.00^b	0.04 ± 0.00^c
		20	0.09 ± 0.00^a	0.08 ± 0.00^a	0.15 ± 0.01^b
		37	0.18 ± 0.02^b	0.16 ± 0.00^b	0.24 ± 0.03^c
		50	0.34 ± 0.03^b	0.23 ± 0.03^c	0.17 ± 0.00^d
Luteína 3- <i>O</i> -linoleato	0.36 ± 0.01^a	4	0.30 ± 0.03^b	0.25 ± 0.00^c	0.21 ± 0.01^c
		20	0.27 ± 0.00^b	0.29 ± 0.00^b	0.59 ± 0.04^c
		37	0.38 ± 0.03^a	0.40 ± 0.00^a	0.49 ± 0.04^b
		50	0.47 ± 0.03^b	0.42 ± 0.02^b	0.33 ± 0.01^a
Luteína monopalmitato	1.01 ± 0.03^a	4	0.98 ± 0.09^a	0.71 ± 0.00^b	0.53 ± 0.02^c
		20	0.78 ± 0.00^b	0.66 ± 0.01^a	0.96 ± 0.06^c
		37	0.91 ± 0.05^a	0.76 ± 0.00^b	0.77 ± 0.03^b
		50	0.93 ± 0.03^a	0.60 ± 0.03^b	0.51 ± 0.02^b
Luteína 3'- <i>O</i> -palmitato	0.31 ± 0.01^a	4	0.32 ± 0.03^a	0.21 ± 0.00^b	0.15 ± 0.01^c
		20	0.27 ± 0.00^b	0.19 ± 0.00^{ab}	0.29 ± 0.02^c
		^{ab} 37	0.35 ± 0.02^b	0.26 ± 0.00^c	0.29 ± 0.02^{ac}
		50	0.39 ± 0.02^b	0.25 ± 0.02^c	0.21 ± 0.01^c
Luteína 3- <i>O</i> -palmitato	0.69 ± 0.02^a	4	0.66 ± 0.06^a	0.50 ± 0.00^b	0.38 ± 0.02^c
		20	0.51 ± 0.00^b	0.47 ± 0.01^b	0.67 ± 0.04^a
		37	0.56 ± 0.03^b	0.50 ± 0.00^{bc}	0.48 ± 0.01^c
		50	0.53 ± 0.01^b	0.36 ± 0.01^c	0.30 ± 0.01^c
Luteína dilinoleato	0.01 ± 0.00^a	4	0.01 ± 0.00^{ab}	0.01 ± 0.00^c	0.01 ± 0.00^{ab}
		^{ab} 20	0.01 ± 0.00^a	0.01 ± 0.00^b	0.01 ± 0.00^c
		37	0.02 ± 0.00^a	0.03 ± 0.00^a	0.07 ± 0.02^b
		50	0.07 ± 0.02^{bc}	0.13 ± 0.04^c	0.07 ± 0.00^{ab}
Luteína dipalmitato	0.07 ± 0.00^a	4	0.06 ± 0.01^a	0.05 ± 0.00^b	0.04 ± 0.00^b
		20	0.04 ± 0.00^b	0.05 ± 0.00^b	0.04 ± 0.00^b
		37	0.06 ± 0.00^b	0.06 ± 0.00^{ab}	0.07 ± 0.00^{ab}
		50	0.07 ± 0.00^{ab}	0.07 ± 0.01^{ab}	0.05 ± 0.00^b

Luteína linoleatopalmitato	0.05 ± 0.00^a	4	0.04 ± 0.00^a	0.03 ± 0.00^b	0.03 ± 0.00^b
		20	0.03 ± 0.00^b	0.04 ± 0.00^c	0.04 ± 0.00^c
		37	0.06 ± 0.01^{ab}	0.08 ± 0.00^b	0.13 ± 0.02^c
		50	0.12 ± 0.02^b	0.17 ± 0.04^b	0.12 ± 0.00^b
all- <i>trans</i> -β-Caroteno	0.08 ± 0.00^a	4	0.10 ± 0.01^a	0.07 ± 0.00^b	0.04 ± 0.00^c
		20	0.08 ± 0.00^a	0.05 ± 0.00^b	0.04 ± 0.00^c
		37	0.07 ± 0.00^b	0.04 ± 0.00^c	0.03 ± 0.00^d
		50	0.04 ± 0.00^b	0.02 ± 0.00^c	0.01 ± 0.00^c

¹Los datos representan la media y el error estándar (n=4 para el control; n=2 para resto de muestras). Letras superíndice diferentes para una misma temperatura de almacenamiento indican diferencias significativas (test de Duncan, $p < 0.05$).

Tabla A27. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides totales ($\mu\text{g/g PF}$)¹ durante el almacenamiento prolongado (12 meses) de granos maduros de tritordeum (variedad HT621) y trigo duro (variedad Don Pedro).

Carotenoides totales	Contenido inicial ($\mu\text{g/g}$)	Temp (°C)	Tiempo de almacenamiento (meses)											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tritordeum HT621	7.79 \pm 0.07 a	-32	7.36 \pm 0.03 b	7.34 \pm 0.11 b	7.23 \pm 0.02 b	6.79 \pm 0.01 c	6.30 \pm 0.06 d	6.18 \pm 0.03 a	6.11 \pm 0.04 e	6.09 \pm 0.07 d	6.10 \pm 0.11 d	5.99 \pm 0.26 d	5.80 \pm 0.02 d	5.48 \pm 0.01 f
		6	7.31 \pm 0.02 c	7.00 \pm 0.01 d	7.30 \pm 0.02 c	6.92 \pm 0.05 e	5.99 \pm 0.03 a	6.21 \pm 0.05 b	5.78 \pm 0.01 f	5.82 \pm 0.01 g	6.11 \pm 0.03 f	6.00 \pm 0.01 f	5.64 \pm 0.00 f	5.41 \pm 0.01 h
		20	7.10 \pm 0.03 b	6.85 \pm 0.09 c	6.85 \pm 0.02 c	6.44 \pm 0.05 d	5.60 \pm 0.04 b	5.67 \pm 0.03 e	5.68 \pm 0.04 f	5.54 \pm 0.03 g	5.44 \pm 0.05 gh	5.42 \pm 0.02 g	4.93 \pm 0.03 h	4.38 \pm 0.00 e
		37	6.61 \pm 0.05 b	5.86 \pm 0.06 c	6.08 \pm 0.07 d	5.40 \pm 0.03 e	5.01 \pm 0.05 cd	4.46 \pm 0.04 b	4.39 \pm 0.02 f	4.37 \pm 0.10 f	4.00 \pm 0.05 g	3.79 \pm 0.01 g	3.41 \pm 0.02 h	3.28 \pm 0.13 cd
		50	5.64 \pm 0.04 b	4.40 \pm 0.04 c	3.75 \pm 0.01 d	3.00 \pm 0.01 e	2.78 \pm 0.02 f	2.68 \pm 0.03 g	2.31 \pm 0.03 h	2.02 \pm 0.01 i	1.61 \pm 0.02 jk	1.51 \pm 0.04 j	1.38 \pm 0.04 k	0.76 \pm 0.01 l
Trigo duro Don Pedro	1.42 \pm 0.02 a	-32	1.31 \pm 0.01 ab	1.27 \pm 0.01 ab	1.25 \pm 0.02 a	1.22 \pm 0.02 ab	1.22 \pm 0.01 c	1.22 \pm 0.01 b	1.18 \pm 0.00 d	1.10 \pm 0.01 c	1.13 \pm 0.00 c	1.08 \pm 0.02 c	1.07 \pm 0.01 c	1.03 \pm 0.02 e
		6	1.30 \pm 0.01 a	1.25 \pm 0.01 b	1.20 \pm 0.01 c	1.17 \pm 0.01 c	1.14 \pm 0.01 a	1.08 \pm 0.00 d	1.11 \pm 0.01 e	1.06 \pm 0.02 f	1.04 \pm 0.00 f	1.03 \pm 0.00 f	1.02 \pm 0.01 c	0.99 \pm 0.01 g
		20	1.30 \pm 0.03 ab	1.17 \pm 0.02 c	1.15 \pm 0.02 c	1.11 \pm 0.01 d	1.10 \pm 0.01 b	0.97 \pm 0.00 e	0.88 \pm 0.01 f	0.91 \pm 0.01 g	0.84 \pm 0.00 g	0.84 \pm 0.00 g	0.84 \pm 0.00 f	0.79 \pm 0.01 h
		37	1.11 \pm 0.01 b	1.00 \pm 0.03 c	0.92 \pm 0.01 d	0.80 \pm 0.03 e	0.64 \pm 0.00 ef	0.63 \pm 0.01 df	0.58 \pm 0.00 g	0.56 \pm 0.01 g	0.46 \pm 0.00 h	0.43 \pm 0.00 h	0.41 \pm 0.01 h	0.32 \pm 0.01 i
		50	0.63 \pm 0.02 b	0.56 \pm 0.00 c	0.48 \pm 0.01 d	0.38 \pm 0.01 e	0.23 \pm 0.00 f	0.20 \pm 0.01 d	0.14 \pm 0.00 g	0.14 \pm 0.00 f	0.10 \pm 0.00 h	0.02 \pm 0.00 i	0.02 \pm 0.00 i	0.01 \pm 0.00 j

¹Los datos representan la media y el error estándar (n=4 para el control; n=3 para resto de muestras). Letras diferentes para una misma temperatura de almacenamiento indican diferencias significativas (test de Duncan, p<0.05).

Tabla A28. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides individuales ($\mu\text{g/g PF}$)¹ durante el almacenamiento prolongado (12 meses) de granos maduros de trigo duro (variedad Don Pedro).

Don Pedro		Tiempo de almacenamiento (meses)												
Carotenoide	Contenido inicial ($\mu\text{g/g}$)	Temp (°C)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
all- <i>trans</i> -Zeaxanteno	0.08 \pm 0.00 a	-32	0.08 \pm 0.00 a	0.08 \pm 0.00 a	0.08 \pm 0.00 a	0.08 \pm 0.00 b	0.08 \pm 0.00 cd	0.08 \pm 0.00 a	0.07 \pm 0.00 e	0.07 \pm 0.00 c	0.07 \pm 0.00 c	0.07 \pm 0.00 c	0.07 \pm 0.00 d	0.07 \pm 0.00 f
		6	0.09 \pm 0.00 a	0.08 \pm 0.00 ab	0.08 \pm 0.00 c	0.08 \pm 0.00 d	0.07 \pm 0.00 bc	0.07 \pm 0.00 e	0.07 \pm 0.00 d	0.06 \pm 0.00 f	0.07 \pm 0.00 g	0.07 \pm 0.00 f	0.06 \pm 0.00 dg	0.06 \pm 0.00 h
		20	0.08 \pm 0.00 b	0.08 \pm 0.00 cd	0.07 \pm 0.00 c	0.07 \pm 0.00 e	0.07 \pm 0.00 d	0.06 \pm 0.00 ab	0.06 \pm 0.00 ef	0.06 \pm 0.00 g	0.06 \pm 0.00 gh	0.05 \pm 0.00 gh	0.05 \pm 0.00 fh	0.05 \pm 0.00 i
		37	0.08 \pm 0.00 a	0.07 \pm 0.00 b	0.07 \pm 0.00 b	0.06 \pm 0.00 c	0.05 \pm 0.00 b	0.05 \pm 0.00 b	0.05 \pm 0.00 d	0.05 \pm 0.00 d	0.04 \pm 0.00 e	0.04 \pm 0.00 e	0.04 \pm 0.00 e	0.03 \pm 0.00 f
		50	0.06 \pm 0.00 b	0.05 \pm 0.00 c	0.05 \pm 0.00 d	0.04 \pm 0.00 e	0.03 \pm 0.00 f	0.02 \pm 0.00 e	0.02 \pm 0.00 g	0.01 \pm 0.00 h	0.01 \pm 0.00 g	0.00 \pm 0.00 i	0.00 \pm 0.00 i	0.00 \pm 0.00 j
all- <i>trans</i> -Luteína	1.11 \pm 0.01 a	-32	1.07 \pm 0.01 ab	1.04 \pm 0.01 ab	1.02 \pm 0.01 b	0.98 \pm 0.02 ab	0.98 \pm 0.01 c	0.97 \pm 0.01 ab	0.95 \pm 0.00 d	0.90 \pm 0.01 c	0.91 \pm 0.00 c	0.88 \pm 0.01 c	0.87 \pm 0.01 c	0.84 \pm 0.01 e
		6	1.08 \pm 0.01 a	1.02 \pm 0.01 b	0.98 \pm 0.01 c	0.94 \pm 0.01 d	0.94 \pm 0.00 a	0.89 \pm 0.00 e	0.90 \pm 0.01 f	0.86 \pm 0.01 g	0.85 \pm 0.00 g	0.83 \pm 0.00 g	0.83 \pm 0.01 cd	0.80 \pm 0.01 h
		20	1.07 \pm 0.03 b	0.95 \pm 0.02 c	0.93 \pm 0.02 cd	0.90 \pm 0.01 d	0.89 \pm 0.01 b	0.78 \pm 0.00 a	0.71 \pm 0.01 e	0.72 \pm 0.01 f	0.67 \pm 0.01 f	0.67 \pm 0.00 f	0.67 \pm 0.00 e	0.62 \pm 0.00 g
		37	0.89 \pm 0.01 b	0.78 \pm 0.02 c	0.71 \pm 0.01 d	0.61 \pm 0.02 e	0.49 \pm 0.00 f	0.48 \pm 0.00 df	0.43 \pm 0.00 g	0.42 \pm 0.01 g	0.35 \pm 0.00 h	0.31 \pm 0.00 hi	0.29 \pm 0.01 i	0.23 \pm 0.01 j
		50	0.46 \pm 0.02 b	0.40 \pm 0.00 c	0.34 \pm 0.01 d	0.26 \pm 0.00 e	0.15 \pm 0.00 f	0.13 \pm 0.00 g	0.08 \pm 0.00 h	0.08 \pm 0.00 f	0.05 \pm 0.00 i	0.00 \pm 0.00 j	0.00 \pm 0.00 j	0.00 \pm 0.00 j
<i>cis</i> -Luteína	0.17 \pm 0.00 a	-32	0.18 \pm 0.00 a	0.16 \pm 0.00 bcd	0.16 \pm 0.00 bcd	0.17 \pm 0.00 a	0.17 \pm 0.00 cde	0.18 \pm 0.00 f	0.17 \pm 0.00 g	0.15 \pm 0.00 cde	0.16 \pm 0.00 bc	0.14 \pm 0.00 e	0.15 \pm 0.00 de	0.14 \pm 0.00 g
		6	0.16 \pm 0.00 a	0.17 \pm 0.00 a	0.16 \pm 0.00 ab	0.17 \pm 0.00 a	0.14 \pm 0.00 a	0.14 \pm 0.00 c	0.16 \pm 0.00 ab	0.15 \pm 0.00 d	0.14 \pm 0.00 d	0.14 \pm 0.00 d	0.14 \pm 0.00 ab	0.14 \pm 0.00 e
		20	0.16 \pm 0.00 ab	0.16 \pm 0.00 cd	0.16 \pm 0.00 bc	0.15 \pm 0.00 e	0.15 \pm 0.00 f	0.14 \pm 0.00 g	0.13 \pm 0.00 de	0.14 \pm 0.00 hi	0.12 \pm 0.00 j	0.12 \pm 0.00 ij	0.12 \pm 0.00 eh	0.12 \pm 0.00 k
		37	0.16 \pm 0.00 b	0.16 \pm 0.00 ab	0.14 \pm 0.00 cd	0.14 \pm 0.00 de	0.10 \pm 0.00 e	0.11 \pm 0.00 bc	0.11 \pm 0.00 f	0.10 \pm 0.00 f	0.08 \pm 0.00 g	0.08 \pm 0.00 g	0.08 \pm 0.00 g	0.06 \pm 0.00 h
		50	0.12 \pm 0.00 b	0.10 \pm 0.00 c	0.09 \pm 0.00 d	0.08 \pm 0.00 e	0.05 \pm 0.00 f	0.04 \pm 0.00 c	0.03 \pm 0.00 g	0.04 \pm 0.00 f	0.02 \pm 0.00 g	0.00 \pm 0.00 h	0.00 \pm 0.00 h	0.00 \pm 0.00 h
Luteína monolinoleato	0.02 \pm 0.00 ab	-32	0.02 \pm 0.00 c	0.02 \pm 0.00 ac	0.02 \pm 0.00 ac	0.02 \pm 0.00 ac	0.02 \pm 0.00 b	0.02 \pm 0.00 c	0.02 \pm 0.00 d	0.02 \pm 0.00 ab	0.02 \pm 0.00 b	0.02 \pm 0.00 ab	0.02 \pm 0.00 b	0.02 \pm 0.00 e
		6	0.02 \pm 0.00 abc	0.02 \pm 0.00 a	0.02 \pm 0.00 ab	0.02 \pm 0.00 abc	0.02 \pm 0.00 a	0.02 \pm 0.00 d	0.02 \pm 0.00 abc	0.02 \pm 0.00 bc	0.02 \pm 0.00 c	0.02 \pm 0.00 abc	0.02 \pm 0.00 abc	0.02 \pm 0.00 e
		20	0.02 \pm 0.00 a	0.02 \pm 0.00 bc	0.02 \pm 0.00 bc	0.02 \pm 0.00 abc	0.02 \pm 0.00 d	0.02 \pm 0.00 d	0.02 \pm 0.00 ac	0.02 \pm 0.00 ac	0.02 \pm 0.00 abc	0.02 \pm 0.00 abc	0.02 \pm 0.00 b	0.02 \pm 0.00 e
		37	0.02 \pm 0.00 a	0.02 \pm 0.00 a	0.02 \pm 0.00 ac	0.02 \pm 0.00 a	0.02 \pm 0.00 c	0.02 \pm 0.00 d	0.02 \pm 0.00 a	0.02 \pm 0.00 a	0.02 \pm 0.00 a	0.02 \pm 0.00 a	0.02 \pm 0.00 a	0.02 \pm 0.00 b
		50	0.02 \pm 0.00 a	0.02 \pm 0.00 c	0.02 \pm 0.00 c	0.02 \pm 0.00 c	0.02 \pm 0.00 bd	0.02 \pm 0.00 e	0.02 \pm 0.00 f	0.02 \pm 0.00 cd	0.01 \pm 0.00 ab	0.01 \pm 0.00 g	0.01 \pm 0.00 fg	0.01 \pm 0.00 h
Luteína 3'- <i>O</i> -linoleato	0.01 \pm 0.00 ab	-32	0.01 \pm 0.00 ae	0.01 \pm 0.00 abce	0.01 \pm 0.00 abe	0.01 \pm 0.00 abe	0.01 \pm 0.00 abe	0.01 \pm 0.00 abe	0.01 \pm 0.00 e	0.01 \pm 0.00 cdf	0.01 \pm 0.00 f	0.01 \pm 0.00 bcd	0.01 \pm 0.00 df	0.01 \pm 0.00 g
		6	0.01 \pm 0.00 abcd	0.01 \pm 0.00 abc	0.01 \pm 0.00 ab	0.01 \pm 0.00 abcd	0.01 \pm 0.00 abc	0.01 \pm 0.00 e	0.01 \pm 0.00 bcd	0.01 \pm 0.00 d	0.01 \pm 0.00 d	0.01 \pm 0.00 bcd	0.01 \pm 0.00 cd	0.01 \pm 0.00 f
		20	0.01 \pm 0.00 cd	0.01 \pm 0.00 cd	0.01 \pm 0.00 cd	0.01 \pm 0.00 ac	0.01 \pm 0.00 d	0.01 \pm 0.00 e	0.01 \pm 0.00 bf	0.01 \pm 0.00 f	0.01 \pm 0.00 abf	0.01 \pm 0.00 ab	0.01 \pm 0.00 ab	0.01 \pm 0.00 g

Luteína 3- <i>O</i> -linoleato	0.01 ± 0.00 a	37	0.01 ± 0.00 ac	0.01 ± 0.00 ac	0.01 ± 0.00 ac	0.01 ± 0.00 ab	0.01 ± 0.00 c	0.01 ± 0.00 d	0.01 ± 0.00 be	0.01 ± 0.00 ab	0.01 ± 0.00 b	0.01 ± 0.00 ab	0.01 ± 0.00 ab	0.01 ± 0.00 e
		50	0.01 ± 0.00 c	0.01 ± 0.00 a	0.01 ± 0.00 a	0.01 ± 0.00 a	0.01 ± 0.00 bc	0.01 ± 0.00 d	0.01 ± 0.00 e	0.01 ± 0.00 ab	0.01 ± 0.00 c	0.01 ± 0.00 f	0.01 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 g
		-32	0.01 ± 0.00 abc	0.01 ± 0.00 ab	0.01 ± 0.00 ab	0.01 ± 0.00 ab	0.01 ± 0.00 c	0.01 ± 0.00 ad	0.01 ± 0.00 de	0.01 ± 0.00 ab	0.01 ± 0.00 abc	0.01 ± 0.00 ab	0.01 ± 0.00 bc	0.01 ± 0.00 e
		6	0.01 ± 0.00 a	0.01 ± 0.00 a	0.01 ± 0.00 a	0.01 ± 0.00 a	0.01 ± 0.00 a	0.01 ± 0.00 b	0.01 ± 0.00 a	0.01 ± 0.00 a	0.01 ± 0.00 a	0.01 ± 0.00 a	0.01 ± 0.00 a	0.01 ± 0.00 c
		20	0.01 ± 0.00 b	0.01 ± 0.00 ab	0.01 ± 0.00 ab	0.01 ± 0.00 ab	0.01 ± 0.00 c	0.01 ± 0.00 c	0.01 ± 0.00 ab	0.01 ± 0.00 ab	0.01 ± 0.00 b	0.01 ± 0.00 b	0.01 ± 0.00 b	0.01 ± 0.00 d
Luteína monopalmitato	0.02 ± 0.00 a	37	0.01 ± 0.00 ab	0.01 ± 0.00 abc	0.01 ± 0.00 cd	0.01 ± 0.00 ac	0.01 ± 0.00 de	0.01 ± 0.00 e	0.01 ± 0.00 abc	0.01 ± 0.00 cd	0.01 ± 0.00 ac	0.01 ± 0.00 abc	0.01 ± 0.00 ac	0.01 ± 0.00 b
		50	0.01 ± 0.00 ab	0.01 ± 0.00 c	0.01 ± 0.00 c	0.01 ± 0.00 c	0.01 ± 0.00 ce	0.01 ± 0.00 d	0.01 ± 0.00 af	0.01 ± 0.00 c	0.01 ± 0.00 be	0.01 ± 0.00 f	0.01 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 g
		-32	0.02 ± 0.00 a	0.02 ± 0.00 a	0.02 ± 0.00 ab	0.02 ± 0.00 cd	0.02 ± 0.00 a	0.02 ± 0.00 ce	0.02 ± 0.00 d	0.02 ± 0.00 be	0.02 ± 0.00 f	0.02 ± 0.00 g	0.02 ± 0.00 f	0.02 ± 0.00 h
		6	0.02 ± 0.00 b	0.02 ± 0.00 b	0.02 ± 0.00 b	0.02 ± 0.00 b	0.02 ± 0.00 b	0.02 ± 0.00 c	0.02 ± 0.00 b	0.02 ± 0.00 b	0.01 ± 0.00 d	0.02 ± 0.00 e	0.01 ± 0.00 e	0.02 ± 0.00 f
		20	0.02 ± 0.00 bc	0.02 ± 0.00 bc	0.02 ± 0.00 bc	0.02 ± 0.00 b	0.02 ± 0.00 d	0.02 ± 0.00 d	0.01 ± 0.00 c	0.01 ± 0.00 c	0.01 ± 0.00 e	0.01 ± 0.00 e	0.01 ± 0.00 e	0.01 ± 0.00 f
Luteína 3'- <i>O</i> -palmitato	0.01 ± 0.00 a	37	0.02 ± 0.00 bc	0.02 ± 0.00 bc	0.02 ± 0.00 bd	0.02 ± 0.00 bc	0.01 ± 0.00 bd	0.01 ± 0.00 bdef	0.01 ± 0.00 g	0.01 ± 0.00 e	0.01 ± 0.00 def	0.01 ± 0.00 ef	0.01 ± 0.00 bdf	0.01 ± 0.00 c
		50	0.02 ± 0.00 bc	0.02 ± 0.00 d	0.01 ± 0.00 bd	0.01 ± 0.00 d	0.01 ± 0.00 c	0.01 ± 0.00 e	0.01 ± 0.00 cf	0.01 ± 0.00 d	0.01 ± 0.00 d	0.01 ± 0.00 cf	0.00 ± 0.00 cf	0.00 ± 0.00 f
		-32	0.01 ± 0.00 a	0.01 ± 0.00 a	0.01 ± 0.00 a	0.01 ± 0.00 bc	0.01 ± 0.00 a	0.01 ± 0.00 bd	0.01 ± 0.00 ce	0.01 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 ef	0.00 ± 0.00 g	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 h
		6	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 bc	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 f
		20	0.01 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 bc	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 e
Luteína 3- <i>O</i> -palmitato	0.02 ± 0.00 a	37	0.01 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 b	0.01 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 c
		50	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 ce	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 b
		-32	0.02 ± 0.00 abc	0.01 ± 0.00 abc	0.01 ± 0.00 abc	0.01 ± 0.00 b	0.01 ± 0.00 abc	0.01 ± 0.00 abc	0.01 ± 0.00 bc	0.01 ± 0.00 ac	0.01 ± 0.00 d	0.01 ± 0.00 e	0.01 ± 0.00 de	0.01 ± 0.00 f
		6	0.01 ± 0.00 b	0.01 ± 0.00 b	0.01 ± 0.00 b	0.01 ± 0.00 b	0.01 ± 0.00 b	0.01 ± 0.00 c	0.01 ± 0.00 d	0.01 ± 0.00 d	0.01 ± 0.00 e	0.01 ± 0.00 f	0.01 ± 0.00 e	0.01 ± 0.00 g
		20	0.01 ± 0.00 b	0.01 ± 0.00 b	0.01 ± 0.00 b	0.01 ± 0.00 b	0.01 ± 0.00 bc	0.01 ± 0.00 c	0.01 ± 0.00 d	0.01 ± 0.00 d	0.01 ± 0.00 e	0.01 ± 0.00 f	0.01 ± 0.00 e	0.01 ± 0.00 g
all- <i>trans</i> - α -Caroteno	0.01 ± 0.00 a	37	0.02 ± 0.00 b	0.01 ± 0.00 c	0.01 ± 0.00 c	0.01 ± 0.00 c	0.01 ± 0.00 c	0.01 ± 0.00 c	0.01 ± 0.00 d	0.01 ± 0.00 c	0.01 ± 0.00 c	0.01 ± 0.00 c	0.01 ± 0.00 e	0.01 ± 0.00 d
		50	0.01 ± 0.00 b	0.01 ± 0.00 bc	0.01 ± 0.00 d	0.01 ± 0.00 d	0.01 ± 0.00 e	0.01 ± 0.00 c	0.01 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a
		-32	0.01 ± 0.00 ab	0.01 ± 0.00 ac	0.01 ± 0.00 ab	0.01 ± 0.00 ac	0.01 ± 0.00 cd	0.01 ± 0.00 ab	0.01 ± 0.00 b	0.01 ± 0.00 d	0.02 ± 0.00 e	0.02 ± 0.00 f	0.02 ± 0.00 e	0.03 ± 0.00 g
		6	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b
		20	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b
		37	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b
		50	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 b

all- <i>trans</i> -β-Caroteno	0.02 ± 0.00 a	-32	0.02 ± 0.00 a	0.02 ± 0.00 a	0.02 ± 0.00 b	0.02 ± 0.00 c	0.02 ± 0.00 d	0.02 ± 0.00 d	0.02 ± 0.00 c	0.02 ± 0.00 e	0.02 ± 0.00 f	0.02 ± 0.00 f	0.02 ± 0.00 f	0.02 ± 0.00 f
		6	0.02 ± 0.00 a	0.02 ± 0.00 a	0.02 ± 0.00 b	0.02 ± 0.00 c	0.02 ± 0.00 d	0.02 ± 0.00 c	0.02 ± 0.00 bd	0.02 ± 0.00 e	0.02 ± 0.00 e	0.02 ± 0.00 f	0.02 ± 0.00 f	0.02 ± 0.00 f
		20	0.02 ± 0.00 a	0.02 ± 0.00 b	0.02 ± 0.00 a	0.02 ± 0.00 b	0.02 ± 0.00 b	0.02 ± 0.00 a	0.01 ± 0.00 c	0.01 ± 0.00 c	0.01 ± 0.00 d	0.01 ± 0.00 d	0.01 ± 0.00 d	0.01 ± 0.00 d
		37	0.02 ± 0.00 b	0.02 ± 0.00 c	0.02 ± 0.00 d	0.01 ± 0.00 e	0.01 ± 0.00 e	0.01 ± 0.00 e	0.01 ± 0.00 f	0.01 ± 0.00 g	0.01 ± 0.00 g	0.01 ± 0.00 g	0.01 ± 0.00 g	0.00 ± 0.00 g
		50	0.01 ± 0.00 b	0.01 ± 0.00 b	0.01 ± 0.00 c	0.01 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 f

¹Los datos representan la media y el error estándar (n=4 para el control; n=3 para resto de muestras). Letras diferentes para una misma temperatura de almacenamiento indican diferencias significativas (test de Duncan, p<0.05).



Tabla A29. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides individuales ($\mu\text{g/g PF}$)¹ durante el almacenamiento prolongado (12 meses) de granos maduros de tritordeum (variedad HT621).

HT621		Contenido inicial	Tiempo de almacenamiento (meses)											
Carotenoide	($\mu\text{g/g}$)	Temp (°C)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
all- <i>trans</i> -Luteína	4.18 \pm 0.09 a	-32	3.80 \pm 0.03 b	3.93 \pm 0.10 b	3.81 \pm 0.01 b	3.44 \pm 0.01 cd	3.32 \pm 0.03 c	3.38 \pm 0.02 a	3.30 \pm 0.02 e	3.27 \pm 0.04 c	3.38 \pm 0.04 c	3.32 \pm 0.14 c	3.28 \pm 0.02 d	2.88 \pm 0.00 a
		6	3.96 \pm 0.07 b	3.73 \pm 0.02 c	3.77 \pm 0.01 c	3.58 \pm 0.03 d	3.22 \pm 0.05 a	3.35 \pm 0.01 a	3.14 \pm 0.04 e	3.11 \pm 0.01 f	3.18 \pm 0.05 fg	3.05 \pm 0.01 f	3.02 \pm 0.01 eg	2.74 \pm 0.01 a
		20	3.76 \pm 0.02 b	3.51 \pm 0.04 cd	3.31 \pm 0.01 ef	3.23 \pm 0.04 f	2.68 \pm 0.01 de	2.70 \pm 0.01 c	2.73 \pm 0.00 g	2.55 \pm 0.02 h	2.48 \pm 0.02 hi	2.37 \pm 0.01 hi	2.24 \pm 0.04 i	1.88 \pm 0.01 f
		37	3.03 \pm 0.03 b	2.46 \pm 0.03 c	2.52 \pm 0.02 c	1.99 \pm 0.02 d	1.87 \pm 0.01 e	1.58 \pm 0.01 e	1.57 \pm 0.01 fg	1.54 \pm 0.02 f	1.26 \pm 0.02 h	1.12 \pm 0.00 i	1.00 \pm 0.00 i	0.97 \pm 0.05 g
		50	2.37 \pm 0.02 b	1.53 \pm 0.01 c	1.28 \pm 0.00 d	0.85 \pm 0.02 e	0.71 \pm 0.00 f	0.66 \pm 0.02 e	0.59 \pm 0.01 g	0.45 \pm 0.01 h	0.24 \pm 0.00 i	0.26 \pm 0.01 i	0.24 \pm 0.01 i	0.08 \pm 0.00 j
<i>cis</i> -Luteína	0.49 \pm 0.01 a	-32	0.44 \pm 0.00 b	0.46 \pm 0.01 b	0.44 \pm 0.00 b	0.42 \pm 0.01 c	0.39 \pm 0.00 d	0.43 \pm 0.00 e	0.42 \pm 0.01 f	0.39 \pm 0.00 d	0.42 \pm 0.00 c	0.39 \pm 0.02 d	0.40 \pm 0.00 bc	0.35 \pm 0.00 e
		6	0.46 \pm 0.01 b	0.44 \pm 0.00 c	0.43 \pm 0.00 c	0.43 \pm 0.00 c	0.36 \pm 0.01 b	0.42 \pm 0.00 d	0.38 \pm 0.00 e	0.38 \pm 0.00 f	0.37 \pm 0.01 f	0.36 \pm 0.00 g	0.35 \pm 0.00 f	0.32 \pm 0.00 a
		20	0.46 \pm 0.00 b	0.44 \pm 0.00 cd	0.43 \pm 0.00 d	0.45 \pm 0.01 bc	0.37 \pm 0.00 a	0.41 \pm 0.00 e	0.41 \pm 0.00 f	0.39 \pm 0.00 f	0.38 \pm 0.00 g	0.36 \pm 0.00 g	0.37 \pm 0.01 f	0.30 \pm 0.00 h
		37	0.55 \pm 0.00 b	0.50 \pm 0.01 ac	0.50 \pm 0.01 ac	0.45 \pm 0.00 d	0.37 \pm 0.01 e	0.36 \pm 0.00 c	0.37 \pm 0.00 f	0.39 \pm 0.00 f	0.32 \pm 0.01 g	0.29 \pm 0.00 h	0.28 \pm 0.00 h	0.26 \pm 0.01 d
		50	0.63 \pm 0.01 b	0.39 \pm 0.01 c	0.37 \pm 0.00 d	0.28 \pm 0.01 e	0.26 \pm 0.00 e	0.24 \pm 0.01 f	0.21 \pm 0.00 g	0.17 \pm 0.01 h	0.11 \pm 0.00 i	0.11 \pm 0.00 j	0.09 \pm 0.00 i	0.04 \pm 0.00 k
Luteína monolinoleato	0.81 \pm 0.00 a	-32	0.82 \pm 0.00 a	0.80 \pm 0.01 ab	0.79 \pm 0.00 ab	0.78 \pm 0.00 b	0.71 \pm 0.01 c	0.67 \pm 0.00 a	0.68 \pm 0.00 d	0.68 \pm 0.01 c	0.65 \pm 0.02 e	0.64 \pm 0.03 e	0.59 \pm 0.00 e	0.61 \pm 0.00 f
		6	0.78 \pm 0.01 b	0.77 \pm 0.00 b	0.82 \pm 0.00 ac	0.78 \pm 0.00 b	0.66 \pm 0.01 c	0.64 \pm 0.02 d	0.63 \pm 0.01 e	0.65 \pm 0.00 e	0.68 \pm 0.01 e	0.71 \pm 0.00 f	0.62 \pm 0.00 e	0.64 \pm 0.00 g
		20	0.78 \pm 0.00 bc	0.80 \pm 0.01 b	0.85 \pm 0.00 d	0.77 \pm 0.01 c	0.71 \pm 0.01 e	0.73 \pm 0.01 f	0.73 \pm 0.00 gh	0.75 \pm 0.01 g	0.73 \pm 0.01 h	0.73 \pm 0.00 b	0.67 \pm 0.00 gh	0.63 \pm 0.00 i
		37	0.85 \pm 0.01 b	0.82 \pm 0.01 ab	0.89 \pm 0.01 c	0.85 \pm 0.01 ab	0.80 \pm 0.01 d	0.73 \pm 0.00 e	0.73 \pm 0.00 f	0.72 \pm 0.02 f	0.71 \pm 0.01 f	0.70 \pm 0.00 f	0.62 \pm 0.00 g	0.60 \pm 0.02 e
		50	0.78 \pm 0.00 b	0.70 \pm 0.01 a	0.64 \pm 0.00 c	0.54 \pm 0.00 d	0.53 \pm 0.01 d	0.49 \pm 0.00 e	0.40 \pm 0.01 f	0.37 \pm 0.00 g	0.33 \pm 0.00 hi	0.29 \pm 0.01 h	0.25 \pm 0.01 i	0.15 \pm 0.00 j
Luteína 3'- <i>O</i> -linoleato	0.14 \pm 0.00 ab	-32	0.14 \pm 0.00 ab	0.14 \pm 0.00 a	0.13 \pm 0.00 ab	0.13 \pm 0.00 c	0.12 \pm 0.00 d	0.11 \pm 0.00 b	0.11 \pm 0.00 e	0.11 \pm 0.00 fg	0.11 \pm 0.00 h	0.11 \pm 0.01 df	0.10 \pm 0.00 gh	0.10 \pm 0.00 e
		6	0.13 \pm 0.00 a	0.13 \pm 0.00 b	0.14 \pm 0.00 ac	0.13 \pm 0.00 b	0.11 \pm 0.00 d	0.11 \pm 0.00 a	0.11 \pm 0.00 e	0.11 \pm 0.00 f	0.11 \pm 0.00 g	0.11 \pm 0.00 h	0.10 \pm 0.00 g	0.10 \pm 0.00 i
		20	0.13 \pm 0.00 cd	0.14 \pm 0.00 ac	0.14 \pm 0.00 ac	0.13 \pm 0.00 d	0.11 \pm 0.00 b	0.11 \pm 0.00 e	0.11 \pm 0.00 f	0.12 \pm 0.00 g	0.12 \pm 0.00 g	0.12 \pm 0.00 d	0.11 \pm 0.00 g	0.10 \pm 0.00 h
		37	0.15 \pm 0.00 cd	0.14 \pm 0.00 ac	0.15 \pm 0.00 de	0.14 \pm 0.00 ac	0.13 \pm 0.00 e	0.13 \pm 0.00 f	0.13 \pm 0.00 g	0.12 \pm 0.00 g	0.13 \pm 0.00 b	0.13 \pm 0.00 ab	0.12 \pm 0.00 h	0.12 \pm 0.00 i
		50	0.16 \pm 0.00 a	0.15 \pm 0.00 c	0.16 \pm 0.00 b	0.14 \pm 0.00 a	0.14 \pm 0.00 a	0.12 \pm 0.00 d	0.10 \pm 0.00 e	0.09 \pm 0.00 ef	0.09 \pm 0.00 f	0.08 \pm 0.00 g	0.07 \pm 0.00 h	0.05 \pm 0.00 i
Luteína 3- <i>O</i> -linoleato	0.68 \pm 0.00 a	-32	0.68 \pm 0.00 a	0.66 \pm 0.00 abc	0.66 \pm 0.00 bc	0.65 \pm 0.00 c	0.59 \pm 0.01 d	0.56 \pm 0.00 ab	0.57 \pm 0.00 e	0.58 \pm 0.01 d	0.54 \pm 0.01 f	0.53 \pm 0.02 f	0.49 \pm 0.00 f	0.51 \pm 0.00 g
		6	0.65 \pm 0.01 ab	0.64 \pm 0.00 c	0.68 \pm 0.00 bd	0.65 \pm 0.00 ac	0.55 \pm 0.01 d	0.53 \pm 0.02 e	0.52 \pm 0.01 f	0.55 \pm 0.00 f	0.57 \pm 0.01 f	0.60 \pm 0.00 g	0.52 \pm 0.00 f	0.53 \pm 0.00 h
		20	0.65 \pm 0.00 bc	0.66 \pm 0.01 bc	0.71 \pm 0.00 d	0.65 \pm 0.01 c	0.60 \pm 0.00 e	0.61 \pm 0.00 f	0.62 \pm 0.00 gh	0.63 \pm 0.01 g	0.61 \pm 0.00 h	0.62 \pm 0.00 ab	0.56 \pm 0.00 h	0.52 \pm 0.00 i

Luteína monopalmitato	1.36 ± 0.01 a	37	0.70 ± 0.00 a	0.68 ± 0.01 a	0.74 ± 0.01 b	0.70 ± 0.01 a	0.67 ± 0.01 c	0.61 ± 0.00 d	0.60 ± 0.00 e	0.59 ± 0.02 ef	0.58 ± 0.01 ef	0.57 ± 0.00 f	0.50 ± 0.00 g	0.48 ± 0.01 h
		50	0.62 ± 0.00 b	0.56 ± 0.01 c	0.48 ± 0.00 d	0.40 ± 0.00 e	0.38 ± 0.01 f	0.38 ± 0.00 g	0.30 ± 0.01 h	0.28 ± 0.00 i	0.24 ± 0.00 j	0.21 ± 0.01 k	0.18 ± 0.01 j	0.09 ± 0.00 l
		-32	1.35 ± 0.01 ab	1.33 ± 0.01 abc	1.34 ± 0.00 abc	1.31 ± 0.00 bc	1.17 ± 0.02 d	1.03 ± 0.00 c	1.06 ± 0.01 e	1.07 ± 0.01 f	1.00 ± 0.03 g	1.04 ± 0.05 f	0.94 ± 0.00 fg	1.04 ± 0.00 e
		6	1.27 ± 0.03 acd	1.25 ± 0.00 acd	1.37 ± 0.00 ab	1.30 ± 0.01 de	1.04 ± 0.02 ac	1.05 ± 0.03 ac	0.96 ± 0.02 e	0.99 ± 0.00 e	1.11 ± 0.01 de	1.13 ± 0.00 cde	0.97 ± 0.00 e	1.02 ± 0.00 b
		20	1.25 ± 0.00 b	1.26 ± 0.01 b	1.33 ± 0.00 ac	1.15 ± 0.02 d	1.02 ± 0.01 c	1.02 ± 0.01 a	0.98 ± 0.01 e	1.02 ± 0.01 f	1.05 ± 0.00 f	1.11 ± 0.00 g	0.90 ± 0.01 e	0.87 ± 0.00 h
		37	1.28 ± 0.01 b	1.19 ± 0.01 cd	1.21 ± 0.02 c	1.15 ± 0.01 d	1.02 ± 0.01 cd	0.93 ± 0.01 ab	0.87 ± 0.01 e	0.85 ± 0.03 e	0.85 ± 0.01 e	0.84 ± 0.00 e	0.72 ± 0.01 f	0.69 ± 0.02 c
Luteína 3'- <i>O</i> -palmitato	0.43 ± 0.00 a	50	1.09 ± 0.01 b	1.01 ± 0.02 c	0.78 ± 0.01 d	0.65 ± 0.00 e	0.59 ± 0.01 f	0.60 ± 0.00 g	0.48 ± 0.01 h	0.44 ± 0.00 i	0.37 ± 0.01 j	0.35 ± 0.01 k	0.31 ± 0.01 j	0.15 ± 0.00 l
		-32	0.43 ± 0.00 a	0.44 ± 0.00 a	0.43 ± 0.00 a	0.42 ± 0.00 ab	0.38 ± 0.01 c	0.33 ± 0.00 b	0.34 ± 0.00 d	0.34 ± 0.01 ef	0.32 ± 0.01 g	0.32 ± 0.02 e	0.30 ± 0.00 fg	0.34 ± 0.00 h
		6	0.40 ± 0.01 b	0.41 ± 0.00 ab	0.44 ± 0.00 c	0.42 ± 0.00 a	0.33 ± 0.01 ab	0.33 ± 0.01 ab	0.32 ± 0.01 d	0.31 ± 0.00 d	0.35 ± 0.00 e	0.35 ± 0.00 f	0.32 ± 0.00 g	0.34 ± 0.00 h
		20	0.40 ± 0.00 b	0.41 ± 0.00 cd	0.42 ± 0.00 ac	0.36 ± 0.01 e	0.32 ± 0.01 b	0.31 ± 0.00 bd	0.29 ± 0.00 f	0.30 ± 0.00 g	0.32 ± 0.00 h	0.34 ± 0.00 i	0.28 ± 0.00 f	0.27 ± 0.00 j
		37	0.40 ± 0.00 b	0.37 ± 0.00 cd	0.36 ± 0.01 c	0.34 ± 0.00 e	0.29 ± 0.00 e	0.26 ± 0.00 d	0.25 ± 0.00 fg	0.24 ± 0.01 f	0.23 ± 0.00 g	0.23 ± 0.00 g	0.20 ± 0.00 h	0.20 ± 0.01 c
		50	0.35 ± 0.00 b	0.33 ± 0.00 c	0.25 ± 0.00 d	0.22 ± 0.00 e	0.20 ± 0.01 f	0.19 ± 0.00 g	0.16 ± 0.00 h	0.14 ± 0.00 i	0.13 ± 0.00 k	0.12 ± 0.00 j	0.11 ± 0.01 k	0.05 ± 0.00 l
Luteína 3- <i>O</i> -palmitato	0.93 ± 0.01 a	-32	0.92 ± 0.01 ab	0.90 ± 0.01 ab	0.91 ± 0.00 ab	0.89 ± 0.00 b	0.79 ± 0.01 c	0.71 ± 0.00 b	0.72 ± 0.00 d	0.73 ± 0.01 e	0.69 ± 0.02 f	0.72 ± 0.03 ef	0.64 ± 0.00 ef	0.70 ± 0.00 d
		6	0.86 ± 0.02 abc	0.84 ± 0.00 abcd	0.92 ± 0.00 ab	0.88 ± 0.01 d	0.71 ± 0.01 ab	0.72 ± 0.02 ab	0.64 ± 0.01 cd	0.68 ± 0.00 cd	0.76 ± 0.01 acd	0.78 ± 0.00 acd	0.65 ± 0.00 cd	0.68 ± 0.00 b
		20	0.85 ± 0.00 ab	0.84 ± 0.01 c	0.91 ± 0.00 ad	0.79 ± 0.01 e	0.71 ± 0.01 d	0.72 ± 0.01 b	0.70 ± 0.01 f	0.72 ± 0.01 g	0.73 ± 0.00 g	0.77 ± 0.00 e	0.62 ± 0.01 f	0.60 ± 0.00 h
		37	0.88 ± 0.00 b	0.82 ± 0.01 cd	0.85 ± 0.01 bcd	0.82 ± 0.01 d	0.72 ± 0.01 cd	0.66 ± 0.00 a	0.62 ± 0.00 e	0.61 ± 0.02 e	0.62 ± 0.01 e	0.61 ± 0.00 e	0.52 ± 0.00 f	0.49 ± 0.02 bc
		50	0.74 ± 0.01 b	0.68 ± 0.01 c	0.52 ± 0.00 d	0.43 ± 0.00 e	0.39 ± 0.00 f	0.41 ± 0.00 g	0.32 ± 0.01 h	0.30 ± 0.00 i	0.24 ± 0.00 k	0.23 ± 0.01 j	0.21 ± 0.01 k	0.10 ± 0.00 l
		-32	0.12 ± 0.01 a	0.09 ± 0.00 bcd	0.10 ± 0.00 bc	0.10 ± 0.01 bc	0.08 ± 0.00 bd	0.09 ± 0.01 c	0.08 ± 0.00 c	0.09 ± 0.00 bd	0.08 ± 0.01 d	0.07 ± 0.00 d	0.07 ± 0.00 d	0.07 ± 0.00 bc
Luteína dilinoleato	0.12 ± 0.00 a	6	0.11 ± 0.00 ab	0.10 ± 0.00 cde	0.11 ± 0.00 bcd	0.10 ± 0.00 de	0.09 ± 0.01 bc	0.10 ± 0.00 a	0.09 ± 0.00 de	0.10 ± 0.00 e	0.10 ± 0.00 de	0.10 ± 0.00 de	0.09 ± 0.00 de	0.09 ± 0.01 f
		20	0.10 ± 0.01 ab	0.11 ± 0.00 c	0.13 ± 0.00 abc	0.11 ± 0.00 abc	0.12 ± 0.00 d	0.11 ± 0.00 d	0.12 ± 0.01 abc	0.11 ± 0.00 ac	0.12 ± 0.00 abc	0.13 ± 0.00 b	0.12 ± 0.00 ab	0.11 ± 0.00 e
		37	0.12 ± 0.01 abc	0.12 ± 0.00 a	0.15 ± 0.00 bcd	0.14 ± 0.00 bcd	0.16 ± 0.01 e	0.14 ± 0.01 e	0.15 ± 0.00 bcd	0.15 ± 0.00 d	0.15 ± 0.00 cd	0.16 ± 0.01 d	0.15 ± 0.01 bcd	0.14 ± 0.01 f
		50	0.12 ± 0.00 ab	0.12 ± 0.00 c	0.13 ± 0.00 ab	0.13 ± 0.00 abc	0.15 ± 0.00 d	0.14 ± 0.00 e	0.13 ± 0.01 f	0.12 ± 0.00 a	0.12 ± 0.00 bc	0.11 ± 0.00 f	0.11 ± 0.01 f	0.10 ± 0.00 f
		-32	0.36 ± 0.00 a	0.31 ± 0.00 b	0.34 ± 0.00 cd	0.33 ± 0.00 cd	0.28 ± 0.00 e	0.26 ± 0.00 c	0.25 ± 0.00 af	0.27 ± 0.00 g	0.25 ± 0.00 h	0.23 ± 0.01 i	0.22 ± 0.00 hi	0.23 ± 0.00 df
		6	0.33 ± 0.01 c	0.31 ± 0.00 c	0.36 ± 0.01 ad	0.33 ± 0.01 c	0.27 ± 0.00 d	0.28 ± 0.00 ad	0.25 ± 0.00 e	0.26 ± 0.00 e	0.29 ± 0.00 f	0.28 ± 0.00 fg	0.25 ± 0.00 eg	0.25 ± 0.00 b
Luteína dipalmitato	0.37 ± 0.00 a	20	0.32 ± 0.00 b	0.32 ± 0.01 b	0.34 ± 0.01 a	0.31 ± 0.00 bd	0.30 ± 0.00 a	0.30 ± 0.01 c	0.29 ± 0.01 de	0.30 ± 0.01 bde	0.30 ± 0.00 bde	0.30 ± 0.00 be	0.26 ± 0.01 e	0.24 ± 0.00 f
		37	0.34 ± 0.00 bc	0.33 ± 0.00 b	0.35 ± 0.01 abc	0.35 ± 0.00 ac	0.33 ± 0.00 d	0.30 ± 0.01 e	0.29 ± 0.01 f	0.29 ± 0.00 f	0.29 ± 0.00 f	0.28 ± 0.00 f	0.26 ± 0.00 g	0.24 ± 0.00 e
		50	0.27 ± 0.00 b	0.25 ± 0.01 a	0.22 ± 0.00 c	0.20 ± 0.00 cd	0.21 ± 0.00 c	0.2 ± 0.01 a	0.20 ± 0.00 de	0.19 ± 0.00 e	0.17 ± 0.00 f	0.15 ± 0.00 f	0.15 ± 0.00 f	0.08 ± 0.00 g
		-32	0.36 ± 0.00 a	0.31 ± 0.00 b	0.34 ± 0.00 cd	0.33 ± 0.00 cd	0.28 ± 0.00 e	0.26 ± 0.00 c	0.25 ± 0.00 af	0.27 ± 0.00 g	0.25 ± 0.00 h	0.23 ± 0.01 i	0.22 ± 0.00 hi	0.23 ± 0.00 df

Luteína linoleatopalmitato	0.39 ± 0.01 ab	-32	0.40 ± 0.01 a	0.34 ± 0.01 c	0.35 ± 0.00 cd	0.36 ± 0.01 bcd	0.30 ± 0.01 e	0.28 ± 0.00 c	0.27 ± 0.01 a	0.28 ± 0.01 e	0.27 ± 0.01 ef	0.25 ± 0.01 g	0.24 ± 0.00 fg	0.25 ± 0.00 abd
		6	0.34 ± 0.01 cd	0.34 ± 0.01 cde	0.38 ± 0.01 ab	0.35 ± 0.01 c	0.29 ± 0.00 a	0.32 ± 0.00 b	0.29 ± 0.01 de	0.29 ± 0.00 f	0.33 ± 0.00 cde	0.32 ± 0.01 de	0.29 ± 0.00 e	0.30 ± 0.00 g
		20	0.36 ± 0.00 a	0.36 ± 0.01 ab	0.42 ± 0.01 c	0.37 ± 0.01 ab	0.36 ± 0.01 d	0.37 ± 0.00 e	0.38 ± 0.01 ab	0.37 ± 0.01 ab	0.36 ± 0.01 ab	0.39 ± 0.01 b	0.34 ± 0.00 ab	0.31 ± 0.01 f
		37	0.39 ± 0.01 a	0.39 ± 0.01 ab	0.44 ± 0.01 c	0.43 ± 0.00 c	0.44 ± 0.01 d	0.40 ± 0.01 e	0.40 ± 0.00 abc	0.41 ± 0.02 bc	0.40 ± 0.00 abc	0.39 ± 0.00 ab	0.36 ± 0.00 a	0.36 ± 0.01 f
		50	0.34 ± 0.01 a	0.38 ± 0.01 b	0.33 ± 0.00 c	0.32 ± 0.00 d	0.33 ± 0.00 f	0.34 ± 0.01 g	0.30 ± 0.00 hi	0.28 ± 0.00 eh	0.26 ± 0.01 i	0.24 ± 0.01 j	0.23 ± 0.01 j	0.16 ± 0.00 k
		-32	0.06 ± 0.00 ab	0.06 ± 0.00 ac	0.06 ± 0.00 b	0.06 ± 0.00 c	0.05 ± 0.00 d	0.05 ± 0.00 d	0.05 ± 0.00 ab	0.05 ± 0.00 d	0.05 ± 0.00 e	0.05 ± 0.00 c	0.05 ± 0.00 d	0.05 ± 0.00 f
		6	0.06 ± 0.00 ab	0.06 ± 0.00 acd	0.06 ± 0.00 ac	0.06 ± 0.00 ab	0.05 ± 0.00 def	0.04 ± 0.00 g	0.04 ± 0.00 cde	0.04 ± 0.00 f	0.04 ± 0.00 ef	0.05 ± 0.00 def	0.05 ± 0.00 cde	0.05 ± 0.00 de
		20	0.06 ± 0.00 bc	0.05 ± 0.00 bd	0.05 ± 0.00 e	0.05 ± 0.00 bc	0.04 ± 0.00 bc	0.03 ± 0.00 cf	0.03 ± 0.00 gh	0.03 ± 0.00 g	0.03 ± 0.00 f	0.03 ± 0.00 f	0.03 ± 0.00 h	0.03 ± 0.00 de
		37	0.05 ± 0.00 b	0.04 ± 0.00 c	0.04 ± 0.00 b	0.03 ± 0.00 de	0.03 ± 0.00 de	0.02 ± 0.00 d	0.02 ± 0.00 f	0.02 ± 0.00 g	0.02 ± 0.00 f	0.01 ± 0.00 f	0.02 ± 0.00 h	0.01 ± 0.00 e
		50	0.04 ± 0.00 b	0.03 ± 0.00 b	0.02 ± 0.00 c	0.01 ± 0.00 d	0.01 ± 0.00 d	0.01 ± 0.00 d	0.01 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 f
		-32	0.06 ± 0.00 ab	0.06 ± 0.00 ac	0.06 ± 0.00 b	0.06 ± 0.00 c	0.05 ± 0.00 d	0.05 ± 0.00 d	0.05 ± 0.00 ab	0.05 ± 0.00 d	0.05 ± 0.00 e	0.05 ± 0.00 c	0.05 ± 0.00 d	0.05 ± 0.00 f

¹Los datos representan la media y el error estándar (n=4 para el control; n=3 para resto de muestras). Letras diferentes para una misma temperatura de almacenamiento indican diferencias significativas (test de Duncan, p<0.05).

Tabla A30. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides totales ($\mu\text{g/g PF}$)¹ durante el almacenamiento prolongado (12 meses) de harinas integrales de tritordeum (variedad HT621) y trigo duro (variedad Don Pedro).

Carotenoides totales	Contenido inicial ($\mu\text{g/g}$)	Temp (°C)	Tiempo de almacenamiento (meses)											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tritordeum (HT621)	7.83 \pm 0.07 a	-32	7.37 \pm 0.03 a	7.57 \pm 0.11 bcd	7.48 \pm 0.02 b	7.40 \pm 0.01 e	7.40 \pm 0.06 b	7.57 \pm 0.03 bcd	7.63 \pm 0.04 f	7.64 \pm 0.07 cd	7.46 \pm 0.11 bc	7.72 \pm 0.26 d	7.41 \pm 0.02 b	7.28 \pm 0.01 b
		6	7.21 \pm 0.02 ab	7.51 \pm 0.01 ac	7.38 \pm 0.02 d	7.18 \pm 0.05 ef	7.34 \pm 0.03 abg	7.30 \pm 0.05 efg	7.64 \pm 0.01 h	7.58 \pm 0.01 i	7.36 \pm 0.03 ef	7.43 \pm 0.01 de	7.22 \pm 0.00 bfg	6.84 \pm 0.01 c
		20	7.31 \pm 0.03 b	7.25 \pm 0.09 ab	7.07 \pm 0.02 a	6.55 \pm 0.05 c	6.56 \pm 0.04 c	6.21 \pm 0.03 d	6.53 \pm 0.04 a	6.15 \pm 0.03 c	5.81 \pm 0.05 e	5.78 \pm 0.02 de	5.38 \pm 0.03 f	5.34 \pm 0.00 f
		37	6.80 \pm 0.05 a	6.09 \pm 0.06 b	5.23 \pm 0.07 c	4.68 \pm 0.03 d	4.34 \pm 0.05 e	4.38 \pm 0.04 de	4.14 \pm 0.02 e	3.59 \pm 0.10 f	2.99 \pm 0.05 g	2.74 \pm 0.01 g	2.19 \pm 0.02 h	2.18 \pm 0.13 h
		50	5.47 \pm 0.04 b	3.79 \pm 0.04 c	2.64 \pm 0.01 d	1.37 \pm 0.01 e	1.07 \pm 0.02 e	0.82 \pm 0.03 e	0.38 \pm 0.03 f	0.19 \pm 0.01 g	0.11 \pm 0.02 g	-	-	-
Trigo duro (Don Pedro)	1.39 \pm 0.02 ab	-32	1.28 \pm 0.01 a	1.26 \pm 0.01 ab	1.26 \pm 0.02 ab	1.27 \pm 0.01 a	1.27 \pm 0.02 abc	1.27 \pm 0.01 bcd	1.33 \pm 0.04 e	1.32 \pm 0.04 de	1.28 \pm 0.02 bcd	1.30 \pm 0.01 de	1.30 \pm 0.01 cde	1.30 \pm 0.02 de
		6	1.21 \pm 0.01 a	1.25 \pm 0.02 cde	1.28 \pm 0.01 bcf	1.28 \pm 0.01 abf	1.29 \pm 0.06 eg	1.30 \pm 0.02 cdf	1.32 \pm 0.01 g	1.34 \pm 0.01 eg	1.27 \pm 0.02 cde	1.33 \pm 0.02 de	1.29 \pm 0.01 bcf	1.28 \pm 0.01 bcf
		20	1.24 \pm 0.00 c	1.22 \pm 0.01 a	1.22 \pm 0.02 bd	1.17 \pm 0.01 e	1.18 \pm 0.01 de	1.14 \pm 0.01 f	1.17 \pm 0.01 ab	1.10 \pm 0.01 g	1.08 \pm 0.01 fg	1.04 \pm 0.01 f	0.91 \pm 0.01 h	0.89 \pm 0.01 h
		37	1.13 \pm 0.01 a	1.00 \pm 0.01 c	0.86 \pm 0.01 d	0.69 \pm 0.02 e	0.72 \pm 0.04 d	0.60 \pm 0.01 e	0.53 \pm 0.01 f	0.40 \pm 0.00 g	0.36 \pm 0.00 h	0.37 \pm 0.01 gh	0.24 \pm 0.00 i	0.22 \pm 0.00 i
		50	0.68 \pm 0.01 a	0.47 \pm 0.00 c	0.41 \pm 0.01 d	0.32 \pm 0.00 e	0.19 \pm 0.00 f	0.22 \pm 0.00 g	0.15 \pm 0.00 f	0.15 \pm 0.01 f	0.05 \pm 0.00 h	-	-	-

¹Los datos representan la media y el error estándar (n=5 para el control; n=3 para resto de muestras). Letras diferentes para una misma temperatura de almacenamiento indican diferencias significativas (test de Duncan, p<0.05).

Tabla A31. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides individuales ($\mu\text{g/g PF}$)¹ durante el almacenamiento prolongado (12 meses) de harina integral de trigo duro (variedad Don Pedro).

Don Pedro	Contenido inicial ($\mu\text{g/g}$)	Temp (°C)	Tiempo de almacenamiento (meses)											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
all- <i>trans</i> -Zeaxanteno	0.08 ± 0.00 a	-32	0.08 ± 0.00 ab	0.07 ± 0.00 ab	0.08 ± 0.00 a	0.08 ± 0.00 a	0.07 ± 0.00 ab	0.07 ± 0.00 ab	0.08 ± 0.00 b	0.08 ± 0.00 b	0.08 ± 0.00 b	0.08 ± 0.00 ab	0.08 ± 0.00 ab	0.08 ± 0.00 b
		6	0.08 ± 0.00 abc	0.08 ± 0.00 d	0.07 ± 0.00 bc	0.07 ± 0.00 abc	0.07 ± 0.00 ab	0.07 ± 0.00 abc	0.07 ± 0.00 d	0.07 ± 0.00 abc	0.07 ± 0.00 c	0.07 ± 0.00 bc	0.07 ± 0.00 a	0.07 ± 0.00 a
		20	0.07 ± 0.00 c	0.07 ± 0.00 a	0.07 ± 0.01 b	0.06 ± 0.00 d	0.06 ± 0.00 d	0.05 ± 0.00 e	0.05 ± 0.00 d	0.04 ± 0.00 e	0.04 ± 0.00 e	0.04 ± 0.00 e	0.03 ± 0.00 f	0.03 ± 0.00 f
		37	0.06 ± 0.00 b	0.03 ± 0.00 c	0.03 ± 0.00 d	0.02 ± 0.00 e	0.02 ± 0.00 f	0.01 ± 0.00 e	0.01 ± 0.00 e	0.01 ± 0.00 g	0.01 ± 0.00 g	0.01 ± 0.00 g	0.00 ± 0.00 h	0.00 ± 0.00 h
		50	0.02 ± 0.00 b	0.01 ± 0.00 c	0.01 ± 0.00 cd	0.00 ± 0.00 de	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 ef	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 f	-	-	-
all- <i>trans</i> -Luteína	1.08 ± 0.02 a	-32	1.06 ± 0.01 ae	1.04 ± 0.02 abe	1.05 ± 0.02 abce	1.05 ± 0.01 e	1.06 ± 0.02 abcd	1.05 ± 0.01 bcd	1.09 ± 0.03 f	1.09 ± 0.04 f	1.05 ± 0.02 bcd	1.07 ± 0.00 cdf	1.07 ± 0.00 df	1.08 ± 0.02 df
		6	0.98 ± 0.01 a	1.02 ± 0.01 def	1.03 ± 0.00 abc	1.03 ± 0.01 abc	1.04 ± 0.05 de	1.04 ± 0.01 bcf	1.04 ± 0.02 d	1.04 ± 0.01 ef	0.98 ± 0.01 bcef	1.03 ± 0.02 bef	1.00 ± 0.01 abc	0.98 ± 0.01 ac
		20	0.99 ± 0.00 b	0.95 ± 0.01 a	0.92 ± 0.02 c	0.86 ± 0.01 d	0.85 ± 0.01 d	0.79 ± 0.00 e	0.79 ± 0.00 d	0.73 ± 0.01 e	0.71 ± 0.01 e	0.67 ± 0.00 f	0.56 ± 0.01 g	0.53 ± 0.00 g
		37	0.77 ± 0.01 b	0.60 ± 0.01 c	0.47 ± 0.01 d	0.32 ± 0.00 e	0.32 ± 0.01 f	0.27 ± 0.01 g	0.23 ± 0.01 h	0.17 ± 0.00 i	0.15 ± 0.00 i	0.16 ± 0.00 i	0.10 ± 0.00 j	0.10 ± 0.00 j
		50	0.30 ± 0.00 b	0.17 ± 0.00 c	0.16 ± 0.00 cd	0.13 ± 0.00 d	0.07 ± 0.00 e	0.09 ± 0.00 e	0.06 ± 0.00 ef	0.07 ± 0.00 e	0.03 ± 0.00 f	-	-	-
<i>cis</i> -Luteína	0.18 ± 0.00 a	-32	0.17 ± 0.00 d	0.17 ± 0.00 ab	0.16 ± 0.00 ad	0.16 ± 0.00 abc	0.16 ± 0.00 ab	0.17 ± 0.00 bc	0.17 ± 0.00 e	0.18 ± 0.00 f	0.17 ± 0.00 ab	0.17 ± 0.00 f	0.17 ± 0.00 c	0.16 ± 0.00 abc
		6	0.16 ± 0.00 abcd	0.15 ± 0.00 d	0.17 ± 0.00 abc	0.16 ± 0.00 acd	0.15 ± 0.01 e	0.16 ± 0.00 abcd	0.16 ± 0.01 b	0.17 ± 0.00 ab	0.16 ± 0.00 cd	0.17 ± 0.00 abc	0.16 ± 0.00 abc	0.16 ± 0.00 abcd
		20	0.15 ± 0.00 b	0.15 ± 0.00 b	0.16 ± 0.00 b	0.14 ± 0.00 c	0.14 ± 0.00 b	0.13 ± 0.00 d	0.13 ± 0.00 c	0.12 ± 0.00 d	0.13 ± 0.00 d	0.11 ± 0.00 e	0.11 ± 0.00 e	0.11 ± 0.00 e
		37	0.16 ± 0.00 a	0.13 ± 0.00 b	0.09 ± 0.00 c	0.07 ± 0.00 d	0.07 ± 0.00 e	0.06 ± 0.00 d	0.05 ± 0.00 f	0.04 ± 0.00 g	0.03 ± 0.00 g	0.04 ± 0.00 g	0.03 ± 0.00 h	0.02 ± 0.00 h
		50	0.07 ± 0.00 b	0.05 ± 0.00 c	0.05 ± 0.00 d	0.04 ± 0.00 e	0.02 ± 0.00 f	0.03 ± 0.00 g	0.02 ± 0.00 f	0.02 ± 0.00 h	0.01 ± 0.00 i	-	-	-
Luteína monolinoleato	0.03 ± 0.00 a	-32	0.02 ± 0.00 a	0.02 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.02 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 b	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 a
		6	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 b	0.04 ± 0.00 c	0.04 ± 0.00 c	0.05 ± 0.00 d	0.05 ± 0.00 e	0.06 ± 0.00 f	0.06 ± 0.00 g	0.06 ± 0.00 g	0.07 ± 0.00 hi	0.07 ± 0.00 h	0.07 ± 0.00 i
		20	0.04 ± 0.01 b	0.06 ± 0.01 c	0.08 ± 0.01 d	0.08 ± 0.00 d	0.09 ± 0.00 e	0.10 ± 0.00 f	0.11 ± 0.00 g	0.11 ± 0.00 g	0.11 ± 0.00 g	0.12 ± 0.00 g	0.10 ± 0.00 f	0.11 ± 0.00 h
		37	0.09 ± 0.01 b	0.12 ± 0.01 c	0.12 ± 0.00 c	0.12 ± 0.01 bd	0.11 ± 0.01 c	0.08 ± 0.01 d	0.07 ± 0.00 e	0.05 ± 0.01 f	0.04 ± 0.00 f	0.04 ± 0.00 f	0.03 ± 0.01 a	0.03 ± 0.00 a
		50	0.10 ± 0.02 b	0.08 ± 0.01 c	0.06 ± 0.00 d	0.05 ± 0.01 e	0.03 ± 0.01 f	0.03 ± 0.00 g	0.02 ± 0.00 h	0.02 ± 0.00 a	0.01 ± 0.00 i	-	-	-
Luteína 3'- <i>O</i> -linoleato	0.01 ± 0.00 a	-32	0.01 ± 0.00 ab	0.01 ± 0.00 ab	0.01 ± 0.00 ab	0.01 ± 0.00 ab	0.01 ± 0.00 ab	0.01 ± 0.00 ab	0.01 ± 0.00 c	0.01 ± 0.00 ab	0.01 ± 0.00 a	0.01 ± 0.00 b	0.01 ± 0.00 ab	0.01 ± 0.00 ab
		6	0.01 ± 0.00 a	0.02 ± 0.00 b	0.02 ± 0.00 c	0.02 ± 0.00 c	0.02 ± 0.00 d	0.02 ± 0.00 e	0.03 ± 0.00 f	0.03 ± 0.00 g	0.03 ± 0.00 g	0.03 ± 0.00 h	0.03 ± 0.00 h	0.03 ± 0.00 h
		20	0.02 ± 0.00 b	0.03 ± 0.00 c	0.04 ± 0.00 d	0.04 ± 0.00 d	0.05 ± 0.00 e	0.06 ± 0.00 f	0.06 ± 0.00 g	0.06 ± 0.00 gh	0.06 ± 0.00 gi	0.06 ± 0.00 h	0.06 ± 0.00 i	0.06 ± 0.00 gh

Luteína 3- <i>O</i> -linoleato	0.01 ± 0.00 a	37	0.05 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
			b	c	c	b	c	b	d	e	e	e	f	af
		50	0.06 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	-	-	-
			b	c	d	e	a	f	a	a	g	-	-	-
		-32	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
		ab	ab	a	ab	a	ab	ab	c	ab	ab	bc	ab	ab
		6	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00
			a	b	c	c	d	e	f	g	gh	ij	hi	j
		20	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.05 ± 0.00
			b	c	d	e	fg	f	h	i	hi	i	g	fg
		37	0.05 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Luteína monopalmitato	0.01 ± 0.00 a	ab	c	d	e	e	e	fg	g	h	hi	ai	j	bj
		50	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00	-	-	-
			b	c	c	d	e	f	e	a	g	-	-	-
		-32	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
		abc	a	abc	d	d	d	abc	bc	b	ac	b	abc	abc
		6	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00
			b	c	c	d	c	e	ef	g	f	f	f	f
		20	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.00
			b	c	d	d	e	f	g	gh	gh	h	ef	ef
		37	0.06 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Luteína 3'- <i>O</i> -palmitato	0.00 ± 0.00 a	b	c	d	e	d	e	e	e	f	f	f	g	g
		50	0.07 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00	-	-	-
			b	c	d	e	fg	h	af	g	i	-	-	-
		-32	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		abc	ab	abc	d	d	d	abc	abc	abc	a	bc	c	abc
		6	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
			a	b	c	bc	d	e	e	f	f	f	f	f
		20	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00
			b	c	d	d	e	f	g	g	g	g	f	f
		37	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Luteína 3- <i>O</i> -palmitato	0.00 ± 0.00 a	b	c	c	bd	c	bd	d	e	e	e	e	f	f
		-32	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		abcd	ae	abc	ae	e	e	abcd	bcd	d	abe	cd	abc	abcd
		6	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
			b	c	c	b	c	d	d	e	d	d	d	d
		20	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
			b	cde	cdf	ce	fgh	fgh	i	gh	g	dffh	cde	e
		37	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
			b	c	d	e	bd	e	e	f	f	h	g	ag
		50	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	-	-	-
Luteína dilinoleato	0.00 ± 0.00 a	a	b	c	d	e	a	f	a	g	h	-	-	-
		-32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		6	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00
			a	a	a	a	a	a	a	b	c	d	a	c
		20	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.05 ± 0.00
			a	a	a	b	b	c	d	d	d	e	f	e
		37	0.01 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.00
			b	c	d	de	f	fg	fg	eg	de	de	h	h
		50	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.00 ± 0.00	-	-	-
Luteína dipalmitato	0.00 ± 0.00 a		b	b	c	d	e	f	e	e	a	-	-	-
		-32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Luteína linoleatopalmitato	0.00 ± 0.00 a	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		20	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 bc	0.00 ± 0.00 bc	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 cd
		37	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 bc	0.01 ± 0.00 def	0.01 ± 0.00 dgh	0.01 ± 0.00 i	0.01 ± 0.00 gi	0.01 ± 0.00 ghi	0.01 ± 0.00 de	0.01 ± 0.00 deh	0.01 ± 0.00 dh	0.01 ± 0.00 cef
		50	0.01 ± 0.00 b	0.01 ± 0.00 bc	0.01 ± 0.00 c	0.01 ± 0.00 d	0.01 ± 0.00 e	0.01 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 ef	0.00 ± 0.00 ef	0.00 ± 0.00 a	-	-
		-32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		6	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 d
		20	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.00 ± 0.00 a	0.01 ± 0.00 b	0.01 ± 0.00 b	0.01 ± 0.00 c	0.02 ± 0.00 d	0.02 ± 0.00 d	0.02 ± 0.00 d	0.02 ± 0.00 e	0.02 ± 0.00 f
		37	0.01 ± 0.00 b	0.02 ± 0.00 c	0.04 ± 0.00 d	0.04 ± 0.00 d	0.05 ± 0.00 e	0.05 ± 0.00 f	0.05 ± 0.00 f	0.04 ± 0.00 d	0.03 ± 0.00 d	0.03 ± 0.00 d	0.02 ± 0.00 c
		50	0.05 ± 0.00 b	0.05 ± 0.00 c	0.04 ± 0.00 c	0.03 ± 0.00 d	0.02 ± 0.00 e	0.02 ± 0.00 f	0.01 ± 0.00 e	0.01 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 a	-	-
		-32	0.01 ± 0.00 abc	0.01 ± 0.00 ac	0.01 ± 0.00 ab	0.01 ± 0.00 ac	0.01 ± 0.00 b	0.01 ± 0.00 ac	0.01 ± 0.00 d	0.01 ± 0.00 cd	0.01 ± 0.00 ab	0.01 ± 0.00 d	0.01 ± 0.00 d
		6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
all- <i>trans</i> -α-Caroteno	0.01 ± 0.00	-32	0.01 ± 0.00 abc	0.01 ± 0.00 ac	0.01 ± 0.00 ab	0.01 ± 0.00 ac	0.01 ± 0.00 b	0.01 ± 0.00 ac	0.01 ± 0.00 d	0.01 ± 0.00 cd	0.01 ± 0.00 ab	0.01 ± 0.00 d	0.01 ± 0.00 d
		6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-32	0.03 ± 0.00 a	0.03 ± 0.00 cde	0.03 ± 0.00 abc	0.02 ± 0.00 ab	0.02 ± 0.00 abcd	0.03 ± 0.00 e	0.03 ± 0.00 f	0.03 ± 0.00 de	0.03 ± 0.00 abc	0.03 ± 0.00 e	0.03 ± 0.00 de
		6	0.02 ± 0.00 a	0.02 ± 0.00 bc	0.02 ± 0.00 bcde	0.02 ± 0.00 adf	0.02 ± 0.00 cde	0.02 ± 0.00 cdef	0.02 ± 0.00 bce	0.02 ± 0.00 b	0.02 ± 0.00 cde	0.03 ± 0.00 cdef	0.02 ± 0.00 adef
		20	0.02 ± 0.00 abc	0.02 ± 0.00 ab	0.02 ± 0.00 bc	0.02 ± 0.00 cd	0.02 ± 0.00 cd	0.02 ± 0.00 de	0.02 ± 0.00 abc	0.02 ± 0.00 de	0.02 ± 0.00 e	0.02 ± 0.00 f	0.01 ± 0.00 g
all- <i>trans</i> -β-Caroteno	0.02 ± 0.00 a	37	0.02 ± 0.00 b	0.02 ± 0.00 b	0.01 ± 0.00 c	0.01 ± 0.00 de	0.01 ± 0.00 c	0.01 ± 0.00 d	0.01 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 g
		50	0.01 ± 0.00 b	0.01 ± 0.00 c	0.01 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 g	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 f	-	-

Los datos representan la media y el error estándar (n=5 para el control; n=3 para resto de muestras). Letras diferentes para una misma temperatura de almacenamiento indican diferencias significativas (test de Duncan, p<0.05).

Tabla A32. Evolución del contenido de pigmentos carotenoides individuales ($\mu\text{g/g PF}$)¹ durante el almacenamiento prolongado (12 meses) de harina integral de tritordeum (variedad HT621).

Carotenoide	Contenido inicial ($\mu\text{g/g}$)	Temp (°C)	Tiempo de almacenamiento (meses)											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
all- <i>trans</i> -Luteína	3.95 ± 0.04 a	-32	3.73 ± 0.02 a	3.79 ± 0.01 cd	3.79 ± 0.01 bc	3.84 ± 0.04 e	3.82 ± 0.05 df	3.77 ± 0.03 d	3.73 ± 0.01 g	3.79 ± 0.02 df	3.76 ± 0.01 cd	3.88 ± 0.01 f	3.78 ± 0.01 d	3.69 ± 0.02 df
		6	3.55 ± 0.02 a	3.65 ± 0.01 c	3.65 ± 0.03 b	3.62 ± 0.01 ab	3.54 ± 0.02 a	3.47 ± 0.02 d	3.57 ± 0.02 c	3.54 ± 0.01 ab	3.42 ± 0.02 de	3.45 ± 0.02 d	3.36 ± 0.02 e	3.13 ± 0.01 f
		20	3.42 ± 0.02 b	3.22 ± 0.02 c	2.98 ± 0.02 d	2.70 ± 0.01 e	2.49 ± 0.02 f	2.21 ± 0.05 g	2.13 ± 0.00 h	1.86 ± 0.01 i	1.71 ± 0.01 j	1.68 ± 0.01 j	1.52 ± 0.01 k	1.51 ± 0.01 k
		37	2.11 ± 0.02 b	1.40 ± 0.01 c	0.93 ± 0.01 d	0.67 ± 0.02 e	0.48 ± 0.02 f	0.36 ± 0.01 g	0.26 ± 0.00 h	0.19 ± 0.00 i	0.13 ± 0.00 j	0.11 ± 0.00 j	0.07 ± 0.00 j	0.07 ± 0.00 j
		50	0.76 ± 0.01 b	0.26 ± 0.01 c	0.17 ± 0.00 d	0.04 ± 0.00 e	0.05 ± 0.00 e	0.05 ± 0.00 e	0.02 ± 0.00 e	0.01 ± 0.00 e	0.01 ± 0.00 e	-	-	-
<i>cis</i> -Luteína	0.49 ± 0.01 a	-32	0.45 ± 0.00 d	0.44 ± 0.01 ab	0.44 ± 0.00 a	0.42 ± 0.01 d	0.41 ± 0.00 e	0.42 ± 0.00 abcf	0.44 ± 0.01 g	0.43 ± 0.00 cf	0.43 ± 0.00 abcf	0.44 ± 0.02 f	0.43 ± 0.00 cf	0.43 ± 0.00 bcf
		6	0.44 ± 0.01 c	0.44 ± 0.00 ade	0.44 ± 0.00 ade	0.42 ± 0.00 c	0.42 ± 0.01 c	0.42 ± 0.00 cd	0.43 ± 0.00 b	0.44 ± 0.00 a	0.42 ± 0.01 cd	0.44 ± 0.00 ae	0.43 ± 0.00 cde	0.41 ± 0.00 c
		20	0.46 ± 0.00 a	0.44 ± 0.00 a	0.43 ± 0.00 a	0.40 ± 0.01 bc	0.40 ± 0.00 b	0.38 ± 0.00 d	0.37 ± 0.00 cd	0.36 ± 0.00 d	0.33 ± 0.00 e	0.32 ± 0.00 ef	0.31 ± 0.01 f	0.32 ± 0.00 ef
		37	0.50 ± 0.00 b	0.39 ± 0.01 c	0.26 ± 0.01 d	0.20 ± 0.00 e	0.16 ± 0.01 f	0.12 ± 0.00 g	0.09 ± 0.00 h	0.06 ± 0.00 i	0.05 ± 0.01 j	0.03 ± 0.00 jk	0.03 ± 0.00 k	0.02 ± 0.01 k
		50	0.27 ± 0.01 b	0.12 ± 0.01 c	0.08 ± 0.00 d	0.04 ± 0.01 e	0.03 ± 0.00 f	0.02 ± 0.01 f	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.01 e	0.00 ± 0.00 e	-	-	-
Luteína monolinoleato	0.87 ± 0.00 a	-32	0.84 ± 0.00 a	0.86 ± 0.01 bcde	0.84 ± 0.00 bc	0.83 ± 0.00 a	0.83 ± 0.01 b	0.87 ± 0.00 cde	0.89 ± 0.00 f	0.88 ± 0.01 de	0.85 ± 0.02 bcd	0.89 ± 0.03 e	0.85 ± 0.00 bc	0.85 ± 0.00 bc
		6	0.86 ± 0.01 a	0.90 ± 0.00 bc	0.87 ± 0.00 b	0.83 ± 0.00 d	0.88 ± 0.01 b	0.90 ± 0.02 bc	0.92 ± 0.01 e	0.92 ± 0.00 e	0.92 ± 0.01 cfg	0.93 ± 0.00 f	0.93 ± 0.00 fg	0.91 ± 0.00 c
		20	0.91 ± 0.00 b	0.97 ± 0.01 cd	0.99 ± 0.00 c	0.95 ± 0.01 d	1.00 ± 0.01 c	1.00 ± 0.01 c	1.05 ± 0.00 e	1.05 ± 0.01 f	1.03 ± 0.01 g	1.04 ± 0.00 fg	0.98 ± 0.00 c	0.94 ± 0.00 d
		37	1.15 ± 0.01 b	1.16 ± 0.01 b	1.03 ± 0.01 c	0.92 ± 0.01 d	0.84 ± 0.01 e	0.79 ± 0.00 a	0.70 ± 0.00 f	0.59 ± 0.02 g	0.47 ± 0.01 h	0.41 ± 0.00 i	0.30 ± 0.00 j	0.30 ± 0.02 j
		50	1.04 ± 0.00 b	0.66 ± 0.01 c	0.41 ± 0.00 d	0.19 ± 0.00 e	0.13 ± 0.01 e	0.09 ± 0.00 e	0.03 ± 0.01 f	0.00 ± 0.00 g	0.00 ± 0.00 g	-	-	-
Luteína 3'- <i>O</i> -linoleato	0.15 ± 0.00 a	-32	0.14 ± 0.00 a	0.15 ± 0.00 bc	0.15 ± 0.00 b	0.14 ± 0.00 a	0.13 ± 0.00 a	0.15 ± 0.00 bc	0.16 ± 0.00 d	0.16 ± 0.00 cd	0.15 ± 0.00 b	0.16 ± 0.00 cd	0.15 ± 0.00 b	0.15 ± 0.00 b
		6	0.14 ± 0.00 a	0.18 ± 0.00 b	0.18 ± 0.00 b	0.16 ± 0.00 c	0.18 ± 0.00 b	0.20 ± 0.00 d	0.22 ± 0.00 e	0.23 ± 0.00 f	0.22 ± 0.00 e	0.23 ± 0.00 f	0.23 ± 0.00 f	0.25 ± 0.00 g
		20	0.20 ± 0.00 b	0.24 ± 0.00 c	0.27 ± 0.00 d	0.27 ± 0.00 d	0.31 ± 0.00 e	0.34 ± 0.00 f	0.40 ± 0.00 g	0.40 ± 0.00 h	0.42 ± 0.00 g	0.42 ± 0.00 i	0.41 ± 0.00 h	0.39 ± 0.00 j
		37	0.42 ± 0.00 b	0.49 ± 0.00 c	0.47 ± 0.00 d	0.43 ± 0.00 b	0.42 ± 0.01 b	0.42 ± 0.00 b	0.39 ± 0.00 e	0.33 ± 0.01 f	0.27 ± 0.00 g	0.24 ± 0.00 h	0.19 ± 0.00 i	0.19 ± 0.00 i
		50	0.47 ± 0.00 b	0.34 ± 0.00 c	0.20 ± 0.00 d	0.10 ± 0.00 e	0.07 ± 0.00 f	0.06 ± 0.00 f	0.02 ± 0.00 g	0.00 ± 0.00 h	0.00 ± 0.00 h	-	-	-
Luteína 3- <i>O</i> -linoleato	0.72 ± 0.01 a	-32	0.70 ± 0.01 a	0.71 ± 0.00 bcd	0.69 ± 0.01 b	0.69 ± 0.01 a	0.70 ± 0.01 b	0.72 ± 0.01 bcd	0.73 ± 0.00 e	0.73 ± 0.01 cd	0.70 ± 0.00 bc	0.73 ± 0.00 d	0.69 ± 0.00 b	0.70 ± 0.00 bc
		6	0.72 ± 0.00 a	0.72 ± 0.00 c	0.70 ± 0.01 d	0.67 ± 0.00 b	0.70 ± 0.00 d	0.70 ± 0.00 d	0.70 ± 0.00 e	0.69 ± 0.00 e	0.70 ± 0.00 d	0.70 ± 0.00 cd	0.70 ± 0.00 d	0.65 ± 0.00 ab
		20	0.71 ± 0.01 ab	0.72 ± 0.01 c	0.72 ± 0.00 c	0.68 ± 0.00 d	0.68 ± 0.00 d	0.66 ± 0.01 a	0.66 ± 0.00 c	0.65 ± 0.00 bd	0.61 ± 0.01 e	0.61 ± 0.00 e	0.58 ± 0.00 f	0.55 ± 0.00 g
		ab												

Luteína monopalmitato	1.50 ± 0.01 a	37	0.74 ± 0.00 b	0.67 ± 0.00 a	0.56 ± 0.00 c	0.49 ± 0.00 d	0.41 ± 0.02 e	0.37 ± 0.00 f	0.31 ± 0.00 g	0.25 ± 0.00 h	0.19 ± 0.00 i	0.17 ± 0.00 j	0.12 ± 0.00 k	0.12 ± 0.00 k
		50	0.57 ± 0.00 b	0.32 ± 0.00 c	0.22 ± 0.00 d	0.09 ± 0.00 e	0.06 ± 0.00 e	0.04 ± 0.00 e	0.01 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 f	-	-	-
		-32	1.46 ± 0.01 a	1.49 ± 0.01 cd	1.46 ± 0.00 ef	1.44 ± 0.00 a	1.44 ± 0.02 bg	1.50 ± 0.00 cde	1.50 ± 0.01 h	1.52 ± 0.01 cd	1.47 ± 0.03 cef	1.50 ± 0.05 d	1.45 ± 0.00 efg	1.44 ± 0.00 fg
		6	1.45 ± 0.03 a	1.49 ± 0.00 c	1.42 ± 0.00 d	1.36 ± 0.01 a	1.39 ± 0.02 be	1.40 ± 0.03 bde	1.45 ± 0.02 c	1.43 ± 0.00 c	1.42 ± 0.01 de	1.42 ± 0.00 de	1.38 ± 0.00 be	1.30 ± 0.00 f
		20	1.45 ± 0.00 b	1.45 ± 0.01 b	1.39 ± 0.00 a	1.27 ± 0.02 cd	1.25 ± 0.01 ce	1.18 ± 0.01 f	1.24 ± 0.01 e	1.18 ± 0.01 df	1.09 ± 0.00 g	1.06 ± 0.00 g	1.03 ± 0.01 h	0.99 ± 0.00 i
		37	1.40 ± 0.01 a	1.26 ± 0.01 b	0.99 ± 0.02 c	0.80 ± 0.01 d	0.71 ± 0.01 e	0.66 ± 0.01 f	0.57 ± 0.01 g	0.46 ± 0.03 h	0.36 ± 0.01 i	0.29 ± 0.00 j	0.22 ± 0.01 k	0.21 ± 0.02 k
		50	1.10 ± 0.01 b	0.60 ± 0.02 c	0.39 ± 0.01 d	0.16 ± 0.00 e	0.10 ± 0.01 e	0.08 ± 0.00 e	0.02 ± 0.01 f	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.01 f	-	-	-
		-32	0.47 ± 0.01 a	0.49 ± 0.00 bc	0.49 ± 0.01 bde	0.46 ± 0.01 a	0.48 ± 0.01 a	0.50 ± 0.00 bd	0.49 ± 0.00 f	0.51 ± 0.00 bc	0.50 ± 0.00 bde	0.52 ± 0.00 c	0.49 ± 0.00 de	0.48 ± 0.00 e
		6	0.48 ± 0.00 a	0.50 ± 0.00 b	0.48 ± 0.01 c	0.47 ± 0.00 a	0.47 ± 0.00 d	0.50 ± 0.00 c	0.51 ± 0.00 e	0.51 ± 0.00 e	0.52 ± 0.00 b	0.52 ± 0.00 b	0.51 ± 0.00 bc	0.47 ± 0.00 d
		20	0.51 ± 0.01 b	0.54 ± 0.00 c	0.53 ± 0.00 c	0.50 ± 0.00 d	0.50 ± 0.00 b	0.50 ± 0.01 b	0.52 ± 0.00 e	0.52 ± 0.00 c	0.52 ± 0.01 b	0.51 ± 0.00 b	0.51 ± 0.00 d	0.50 ± 0.00 a
		37	0.61 ± 0.00 b	0.61 ± 0.00 b	0.52 ± 0.00 c	0.43 ± 0.00 d	0.40 ± 0.01 e	0.39 ± 0.00 e	0.35 ± 0.00 f	0.29 ± 0.00 g	0.23 ± 0.00 h	0.19 ± 0.00 i	0.15 ± 0.00 j	0.14 ± 0.00 j
		50	0.57 ± 0.00 b	0.35 ± 0.00 c	0.22 ± 0.00 d	0.09 ± 0.00 e	0.06 ± 0.00 e	0.04 ± 0.00 e	0.01 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 f	-	-	-
		-32	0.99 ± 0.01 a	1.00 ± 0.01 bc	0.96 ± 0.01 de	0.97 ± 0.01 a	0.96 ± 0.02 d	1.00 ± 0.01 bce	1.01 ± 0.00 f	1.01 ± 0.01 bc	0.98 ± 0.00 bde	0.98 ± 0.00 c	0.96 ± 0.01 d	0.96 ± 0.00 d
		6	0.97 ± 0.01 ad	0.99 ± 0.00 e	0.94 ± 0.01 cf	0.89 ± 0.00 ad	0.92 ± 0.01 bc	0.90 ± 0.00 ab	0.94 ± 0.00 eg	0.93 ± 0.00 fg	0.90 ± 0.01 ab	0.90 ± 0.00 ab	0.87 ± 0.00 d	0.83 ± 0.00 h
		20	0.94 ± 0.01 a	0.92 ± 0.00 a	0.85 ± 0.00 b	0.77 ± 0.01 c	0.75 ± 0.01 c	0.68 ± 0.01 d	0.72 ± 0.00 e	0.66 ± 0.01 d	0.57 ± 0.01 f	0.55 ± 0.00 f	0.52 ± 0.00 g	0.49 ± 0.00 h
		37	0.79 ± 0.00 b	0.65 ± 0.00 c	0.47 ± 0.00 d	0.37 ± 0.00 e	0.30 ± 0.01 f	0.26 ± 0.00 g	0.21 ± 0.00 h	0.17 ± 0.00 i	0.13 ± 0.00 j	0.10 ± 0.00 k	0.08 ± 0.00 l	0.07 ± 0.00 l
		50	0.52 ± 0.00 b	0.25 ± 0.00 c	0.18 ± 0.00 d	0.07 ± 0.00 e	0.04 ± 0.00 e	0.04 ± 0.00 e	0.01 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 f	0.00 ± 0.00 f	-	-	-
		-32	0.11 ± 0.00 abcde	0.12 ± 0.01 de	0.12 ± 0.00 ade	0.10 ± 0.00 bc	0.11 ± 0.01 abcd	0.13 ± 0.01 e	0.14 ± 0.01 f	0.13 ± 0.00 e	0.11 ± 0.01 abcd	0.12 ± 0.00 abde	0.11 ± 0.00 abc	0.10 ± 0.01 c
		6	0.12 ± 0.01 a	0.14 ± 0.00 b	0.15 ± 0.01 b	0.14 ± 0.00 b	0.18 ± 0.00 c	0.19 ± 0.00 c	0.23 ± 0.00 de	0.23 ± 0.01 d	0.22 ± 0.00 d	0.22 ± 0.00 d	0.22 ± 0.00 d	0.24 ± 0.00 e
		20	0.16 ± 0.00 b	0.20 ± 0.01 c	0.26 ± 0.01 d	0.28 ± 0.01 d	0.35 ± 0.01 e	0.39 ± 0.01 f	0.51 ± 0.00 gh	0.50 ± 0.01 g	0.53 ± 0.01 h	0.55 ± 0.00 i	0.50 ± 0.00 g	0.53 ± 0.01 h
		37	0.42 ± 0.01 b	0.55 ± 0.01 c	0.67 ± 0.00 d	0.74 ± 0.02 e	0.79 ± 0.02 f	0.96 ± 0.01 g	1.02 ± 0.01 h	0.93 ± 0.02 i	0.82 ± 0.01 f	0.82 ± 0.01 j	0.67 ± 0.00 d	0.69 ± 0.01 d
		50	0.69 ± 0.03 b	0.76 ± 0.01 c	0.54 ± 0.01 d	0.37 ± 0.00 e	0.30 ± 0.00 ef	0.23 ± 0.01 f	0.12 ± 0.00 a	0.07 ± 0.00 g	0.04 ± 0.00 g	-	-	-
Luteína dilinoleato	0.12 ± 0.00 a	-32	0.11 ± 0.00 abcde	0.12 ± 0.01 de	0.12 ± 0.00 ade	0.10 ± 0.00 bc	0.11 ± 0.01 abcd	0.13 ± 0.01 e	0.14 ± 0.01 f	0.13 ± 0.00 e	0.11 ± 0.01 abcd	0.12 ± 0.00 abde	0.11 ± 0.00 abc	0.10 ± 0.01 c
		6	0.12 ± 0.01 a	0.14 ± 0.00 b	0.15 ± 0.01 b	0.14 ± 0.00 b	0.18 ± 0.00 c	0.19 ± 0.00 c	0.23 ± 0.00 de	0.23 ± 0.01 d	0.22 ± 0.00 d	0.22 ± 0.00 d	0.22 ± 0.00 d	0.24 ± 0.00 e
		20	0.16 ± 0.00 b	0.20 ± 0.01 c	0.26 ± 0.01 d	0.28 ± 0.01 d	0.35 ± 0.01 e	0.39 ± 0.01 f	0.51 ± 0.00 gh	0.50 ± 0.01 g	0.53 ± 0.01 h	0.55 ± 0.00 i	0.50 ± 0.00 g	0.53 ± 0.01 h
		37	0.42 ± 0.01 b	0.55 ± 0.01 c	0.67 ± 0.00 d	0.74 ± 0.02 e	0.79 ± 0.02 f	0.96 ± 0.01 g	1.02 ± 0.01 h	0.93 ± 0.02 i	0.82 ± 0.01 f	0.82 ± 0.01 j	0.67 ± 0.00 d	0.69 ± 0.01 d
		50	0.69 ± 0.03 b	0.76 ± 0.01 c	0.54 ± 0.01 d	0.37 ± 0.00 e	0.30 ± 0.00 ef	0.23 ± 0.01 f	0.12 ± 0.00 a	0.07 ± 0.00 g	0.04 ± 0.00 g	-	-	-
		-32	0.36 ± 0.00 ad	0.39 ± 0.00 bc	0.37 ± 0.01 ab	0.34 ± 0.01 ad	0.36 ± 0.01 ad	0.39 ± 0.01 bc	0.43 ± 0.01 e	0.40 ± 0.01 c	0.39 ± 0.00 bc	0.40 ± 0.01 c	0.36 ± 0.00 ad	0.34 ± 0.00 d
Luteína dipalmitato	0.41 ± 0.01 a	6	0.34 ± 0.00 b	0.39 ± 0.00 ac	0.37 ± 0.00 a	0.34 ± 0.00 b	0.39 ± 0.01 acd	0.39 ± 0.00 acd	0.43 ± 0.01 e	0.41 ± 0.01 ef	0.40 ± 0.01 df	0.39 ± 0.01 cdf	0.36 ± 0.00 a	0.31 ± 0.00 b
		20	0.38 ± 0.01 ab	0.39 ± 0.00 abc	0.39 ± 0.00 bc	0.35 ± 0.00 a	0.39 ± 0.01 cd	0.36 ± 0.01 abc	0.42 ± 0.01 e	0.39 ± 0.01 de	0.37 ± 0.00 d	0.36 ± 0.00 d	0.32 ± 0.01 ab	0.32 ± 0.01 ab
		37	0.44 ± 0.01 bc	0.44 ± 0.00 bd	0.41 ± 0.01 bd	0.37 ± 0.01 bc	0.37 ± 0.02 bc	0.39 ± 0.01 d	0.37 ± 0.01 d	0.33 ± 0.01 bd	0.28 ± 0.00 c	0.25 ± 0.00 e	0.21 ± 0.00 f	0.19 ± 0.00 f
		50	0.51 ± 0.00 b	0.39 ± 0.01 c	0.30 ± 0.00 d	0.16 ± 0.00 e	0.12 ± 0.00 e	0.08 ± 0.00 e	0.04 ± 0.00 f	0.03 ± 0.00 g	0.01 ± 0.00 fg	-	-	-
		-32	0.36 ± 0.00 ad	0.39 ± 0.00 bc	0.37 ± 0.01 ab	0.34 ± 0.01 ad	0.36 ± 0.01 ad	0.39 ± 0.01 bc	0.43 ± 0.01 e	0.40 ± 0.01 c	0.39 ± 0.00 bc	0.40 ± 0.01 c	0.36 ± 0.00 ad	0.34 ± 0.00 d
		6	0.34 ± 0.00 b	0.39 ± 0.00 ac	0.37 ± 0.00 a	0.34 ± 0.00 b	0.39 ± 0.01 acd	0.39 ± 0.00 acd	0.43 ± 0.01 e	0.41 ± 0.01 ef	0.40 ± 0.01 df	0.39 ± 0.01 cdf	0.36 ± 0.00 a	0.31 ± 0.00 b

Luteína linoleatopalmitato	0.42 ± 0.01 a	-32	0.38 ± 0.01 abcd	0.41 ± 0.00 cef	0.39 ± 0.00 abcde	0.36 ± 0.00 a	0.38 ± 0.01 ab	0.42 ± 0.01 bcdef	0.43 ± 0.00 ef	0.42 ± 0.01 f	0.39 ± 0.00 abcd	0.43 ± 0.01 cdef	0.38 ± 0.01 abd	0.37 ± 0.01 ab
		6	0.38 ± 0.01 a	0.45 ± 0.01 b	0.42 ± 0.00 b	0.42 ± 0.00 b	0.48 ± 0.01 c	0.48 ± 0.00 cd	0.54 ± 0.00 e	0.54 ± 0.01 e	0.51 ± 0.00 fg	0.51 ± 0.00 ef	0.49 ± 0.00 dfg	0.47 ± 0.01 cdg
		20	0.47 ± 0.01 b	0.51 ± 0.00 c	0.55 ± 0.00 d	0.54 ± 0.00 d	0.63 ± 0.01 e	0.63 ± 0.00 e	0.76 ± 0.01 fg	0.75 ± 0.02 f	0.72 ± 0.01 fh	0.73 ± 0.01 g	0.67 ± 0.00 i	0.69 ± 0.01 hi
		37	0.73 ± 0.01 b	0.84 ± 0.01 c	0.90 ± 0.01 d	0.93 ± 0.03 de	0.97 ± 0.03 f	1.08 ± 0.01 g	1.10 ± 0.02 h	1.00 ± 0.02 i	0.86 ± 0.00 ef	0.81 ± 0.01 ef	0.68 ± 0.00 c	0.69 ± 0.01 c
		50	1.06 ± 0.01 b	0.97 ± 0.01 c	0.72 ± 0.00 d	0.42 ± 0.00 e	0.34 ± 0.00 e	0.26 ± 0.01 e	0.14 ± 0.00 f	0.08 ± 0.00 g	0.04 ± 0.00 g	-	-	-
all- <i>trans</i> -β-Caroteno	0.06 ± 0.00 a	-32	0.06 ± 0.00 a	0.06 ± 0.00 bcd	0.06 ± 0.00 bcd	0.07 ± 0.00 a	0.07 ± 0.00 e	0.07 ± 0.00 bce	0.07 ± 0.00 be	0.06 ± 0.00 bcd	0.06 ± 0.00 bcd	0.06 ± 0.00 bce	0.06 ± 0.00 ad	0.06 ± 0.00 acd
		6	0.06 ± 0.00 ab	0.06 ± 0.00 abc	0.06 ± 0.00 d	0.06 ± 0.00 def	0.06 ± 0.00 def	0.06 ± 0.00 cef	0.06 ± 0.00 ef	0.06 ± 0.00 de	0.06 ± 0.00 de	0.06 ± 0.00 def	0.06 ± 0.00 def	0.06 ± 0.00 b
		20	0.06 ± 0.00 ab	0.06 ± 0.00 c	0.06 ± 0.00 c	0.05 ± 0.00 ac	0.05 ± 0.00 bd	0.05 ± 0.00 bde	0.05 ± 0.00 def	0.05 ± 0.00 bd	0.05 ± 0.00 bde	0.05 ± 0.00 efg	0.05 ± 0.00 fg	0.04 ± 0.00 gh
		37	0.06 ± 0.00 a	0.05 ± 0.00 b	0.04 ± 0.00 c	0.04 ± 0.00 c	0.03 ± 0.00 d	0.03 ± 0.00 d	0.03 ± 0.00 d	0.02 ± 0.00 e	0.02 ± 0.00 ef	0.02 ± 0.00 f	0.01 ± 0.00 g	0.01 ± 0.00 g
		50	0.04 ± 0.00 b	0.03 ± 0.00 c	0.02 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 e	-	-	-

Los datos representan la media y el error estándar (n=5 para el control; n=3 para resto de muestras). Letras diferentes para una misma temperatura de almacenamiento indican diferencias significativas (test de Duncan, p<0.05).

8. BIBLIOGRAFÍA.

- AACC (American Association of Cereal Chemists), 2000. AACC Official Method 14-50. En: Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, 10ª edición. St. Paul, Minesota, EEUU.
- Abdel-AAL, E.M., Young, J. C. Akhtar, H. y Rabalski, I. Stability of lutein in wholegrain bakery products naturally high in lutein or fortified with free lutein. *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 10109-10117.
- Abdel-Aal, E.M., Young, J.C., Rabalski, I., Hucl, P. y Fregeau-Reid, J. Identification and quantification of seed carotenoids in selected wheat species. *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 787-794.
- Abdul-Hamid, A., Sulaiman, R.R.R., Osman, A. y Saari, N. Preliminary study of the chemical composition of rice milling fractions stabilized by microwave heating. *J. Food Compos. Anal.* 20 (2007) 627-637.
- Adom, K.K., Sorrells, M.E. y Liu, R.H. Phytochemical profiles and antioxidant activity of wheat varieties. *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 7825-7834.
- Adom, K.K., Sorrells, M.E. y Liu, R.H. Phytochemicals and antioxidant activity of milled fractions of different wheat varieties. *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 2297-2306.
- Agarwal, S. y Rao, A.V. Carotenoids and chronic diseases. *Drug Metab. Drug interact.* 17 (2000) 189-210.
- Ahmed, J., Shivhare, U. S. y Sandhu, K. S. Thermal degradation kinetics of carotenoids and visual color of papaya puree. *J. Food Sci.* 67 (2002) 2692-2695.
- Ahmed, S.S., Lott, M.N. y Marcus, D.M. The macular xanthophylls. *Surv. Ophthalmol.* 50 (2005) 183-193.
- Akhunov, E.D., Akhunova, A.R. y Dvorák, J. BAC libraries of *Triticum urartu*, *Aegilops speltoides* and *Ae. tauschii*, the diploid ancestors of polyploid wheat. *Theor. Appl. Genet* 111 (2005) 1617-1622.
- Al-Babili, S., Hugueney, P., Schledz, M., Welsch, R., Frohnmeyer, H., Laule, O. y Beyer, P. Identification of a novel gene coding for neoxanthin synthase from *Solanum tuberosum*. *FEBS Lett.* 485 (2000) 168-172.
- Albanes, D. β -Carotene and lung cancer: A case study. *Am. J. Clin. Nutr.* 69 (1999) 1345S-1351S.
- Albanes, D., Heinonen, O.P., Huttunen, J.K., Taylor, P.R., Virtamo, J., Edwards, B.K., Haapakoski, J., Rautalahti, M., Hartman, A.M., Palmgren, J. y Greenwald, P. Effects of α -tocopherol and β -carotene supplements on cancer incidence in the alpha-tocopherol beta-carotene cancer prevention study. *Am. J. Clin. Nutr.* 62 (1995) 1427S-1430S.
- Alquézar, B., Rodrigo, M.J. y Zacarías, L. Regulation of carotenoid biosynthesis during fruit maturation in the red-fleshed orange mutant *Cara Cara*. *Phytochem.* 69 (2008) 1997-2007.
- Alquézar, B., Zacarias, L., y Rodrigo, M.J. Molecular and functional characterization of a novel chromoplast-specific lycopene b-cyclase from *Citrus* and its relation to lycopene accumulation. *J. Exp. Bot.* 60 (2009) 1783-1797.
- Aluru, M., Xu, Y., Guo, R., Wang, Z., Li, S., White, W., Wang, K. y Rodermeil, S. Generation of transgenic maize with enhanced provitamin A content. *J. Exp. Botany* 59 (2008) 3551-3562.
- Álvarez, J.B., Ballesteros, J., Arriaga, H.O. y Martín, L.M. Rheological properties and baking performances of flours from hexaploid tritordeums. *J. Cereal Sci.* 23 (1995) 291-299.
- Álvarez, J.B., Ballesteros, J., Sillero, J.A. y Martín, L.M. Tritordeum: a new crop of potential importance in the food industry. *Hereditas* 116 (1992) 193-197.
- Álvarez, J.B., Campos, L.A.C., Martín, A., Sillero, J.A. y Martín, L.M. Genetic analysis of prolamins synthesised by the H^{ch} genome and their effects on gluten strength in hexaploid tritordeum. *Euphytica* 107 (1999a) 177-184.
- Álvarez, J.B., Martín, L.M. y Martín, A. Chromosomal localization of genes for carotenoid pigments using addition lines of *Hordeum chilense* in wheat. *Plant Breeding* 117 (1998) 287-289.
- Álvarez, J.B., Martín, L.M. y Martín, A. Genetic variation for carotenoid pigment content in the amphiploid *Hordeum chilense* x *Triticum turgidum* conv. *durum*. *Plant Breeding* 118 (1999b) 187-189.

- Álvarez, J.B., Urbano, J.M. y Martín, L.M. Effect flour quality from inclusion of the *Hordeum chilense* genome into the genetic background of wheat. *Cereal Chem.* 71 (1994) 517-519.
- Aman, R., Biehl, J., Carle, R., Conrad, J., Biefuss, U., y Schieber, A. Application of HPLC coupled with DAD, APci-MS and NMR to the analysis of lutein and zeaxanthin stereoisomers in thermally processed vegetables. *Food Chem.* 92 (2005b) 753-763.
- Aman, R., Schieber, A. y Carle, R. Effects of heating and illumination on trans-cis isomerization and degradation of β -carotene and lutein in isolated spinach chloroplast. *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005a) 9512-9518.
- Amat, J., Rendón, M., Garrido-Fernández, J., Garrido, A., Rendón-Martos, M. y Pérez-Gálvez, A. Greater flamingos *Phoenicopiterus roseus* use uropygial secretions as makeup. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 65 (2010) 665-673.
- Améndola, J. y Rees, N. (2003). Wheat and Grain Flours. En "Understanding Baking: The art and Science of Baking". Wiley, J y Sons (Eds.), Wiley, New jersey (EEUU), Cap. 1, pag. 1-33.
- Andersen, M.L., Erichsen, H.R., Skibsted, L.H., Graversen, H.B. y Rodrigues-Filho, U.P. Heat induced formation of free radicals in wheat flour. *J. Cereal Sci.* 54 (2011) 494-498.
- Apel, W. y Bock, R. Enhancement of carotenoid biosynthesis in transplastomic tomatoes by induced lycopene-to-provitamin A conversion. *Plant Physiol.* 151 (2009) 59-66.
- Arango, J., Wüst, F., Beyer, P. y Welsch, R. Characterization of phytoene synthases from cassava and their involvement in abiotic stress-mediated responses. *Planta* 232 (2010) 1251-1256.
- Arunga, R.O. y Morrison, W.R. The structural analysis of wheat flour glycerolipids. *Lipids* 6 (1971) 768-776.
- Arya, S.S. y Parihar, D.B. Effect of moisture and temperature on storage changes in lipids and carotenoids of atta (wheat flour). *Nahrung* 25 (1981) 121-126.
- Arya, S.S., Natesan, V., Premavalli, K.S. y Vijayaraghavan, P.K. Effect of pre-freezing on the stability of carotenoids in unblanched air-dried carrots. *Int. J. Food Sci. Technol.* 17 (1982) 109-113.
- Astrog, P. Food carotenoids and cancer prevention: an overview of current research. *Trends Food Sci. Technol.* 8 (1997) 406-413.
- Atienza S.G., Avila, C.M. y Martín, A. The development of a PCR-based marker for *Psy1* from *Hordeum chilense*, a candidate gene for carotenoid content accumulation in tritordeum seeds. *Aust. J. Agric. Res.* 58 (2007d) 767-773.
- Atienza, S., Ballesteros, J., Martín, A. y Hornero-Méndez, D. Genetic variability of carotenoid concentration and degree of esterification among tritordeum (\times *Tritordeum* Ascherson et Graebner) and durum wheat accessions. *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007b) 4244-4251.
- Atienza, S.G., Avila, C.M., Ramírez, M.C. y Martín, A. Application of near infrared reflectance spectroscopy to the determination of carotenoid content in tritordeum for breeding purposes. *Aust. J. Agric. Res.* 56 (2005) 85-89.
- Atienza, S.G., Martín, A., Pecchioni, N., Platani, C. y Cattivelli, L. The nuclear-cytoplasmic interaction controls carotenoid content in wheat. *Euphytica* 159 (2008) 325-331.
- Atienza, S.G., Martín, A.C., Ramírez, M.C., Martín, A. y Ballesteros, J. Effects of *Hordeum chilense* cytoplasm on agronomic traits in common wheat. *Plant Breeding* 126 (2007c) 5-8.
- Atienza, S.G., Ramírez, C.M., Hernández, P. y Martín, A. Chromosomal location of genes for carotenoid pigments in *Hordeum chilense*. *Plant Breeding* 123 (2004) 303-304.
- Atienza, S.G., Ramírez, M.C., Martín, A. y Ballesteros, J. Effects of reciprocal crosses on agronomic performance of tritordeum. *Russ. J. Genet.* 43 (2007a) 865-868.
- Auldrige, M.E., Block, A., Vogel, J.T., Dabney-Smith, C., Mila, I., Bouzayen, M., Magallanes-Lundback, M., DellaPenna, D., McCarty, D.R. y Klee, H.J. Characterization of three members of the *Arabidopsis* carotenoid cleavage dioxygenase family demonstrates the divergent roles of this multifunctional enzyme family. *Plant J.* 45 (2006b) 982-993.
- Auldrige, M.E., McCarty, D.R. y Klee, H.J. Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9 (2006a) 315-321.
- Bach, T.J. Some aspects of isoprenoid biosynthesis in plants? A review. *Lipids* 30 (1995) 191-202.

- Bai, C., Twyman, R.M., Farré, G., Sanahuja, G., Christou, P., Capell, T. y Zhu, C. A golden era- pro-vitamin A enhancement in diverse crops. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 47 (2011) 205-221.
- Bai, L., Kim, E., DellaPenna, D. y Brutnell, T.P. Novel lycopene epsilon cyclase activities in maize revealed through perturbation of carotenoid biosynthesis. *Plant J.* 59 (2009) 588-599.
- Ballesteros, J., Ramírez, M.C., Martínez, C. Barro, F. y Martín, A. Bread-making quality in hexaploid tritordeum with substitutions involving chromosome 1D. *Plant Breeding* 122 (2003) 89-91.
- Ballesteros, J.B., Ramírez, M. C., Martínez, C., Atienza, S.G. y Martín, A. Registration of HT621, a high carotenoid content tritordeum germplasm line. *Crop Sci.* 45 (2005) 2662-2663.
- Barro, F., Fontes, A.G. y Maldonado, J.M. Organic nitrogen content and nitrate and nitrite reductase activities in tritordeum and wheat grown under nitrate or ammonium. *Plant Soil* 135 (1991) 251-256.
- Barros, M., Fleuri, L.F. y Macedo, G.A. Seed lipases: sources, applications and properties- A review. *Brazil J. Chem. Eng.* 27 (2010) 15-29.
- Bartley, G. E. y Scolnik, P. A. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual, attraction, and human health. *Plant Cell* 7 (1995) 1027-1038.
- Bartley, G.E. y Scolnik, P.A. cDNA cloning, expresión during development, and genome mapping of PSY2, a second tomato gene encoding phytoene synthase. *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 25718-21.
- Bartley, G.E., Scolnik, P.A. y Beyer, P. Two Arabidopsis thaliana carotene desaturases, phytoene desaturase and z-carotene desaturase, expressed in *Escherichia coli*, catalyze a poly-cis pathway to yield pro-lycopene. *Eur. J. Biochem.* 259 (1999) 396-403.
- Baysal, T. y Demirdöven, A. Lipoxygenase in fruits and vegetables: A review. *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 491-496.
- Beatty, S., Nolan, J., Kavanagh, H. y O'Donovan, O. Macular pigment optical density and its relationship with serum and dietary levels of lutein and zeaxanthin. *Arch. Biochem. Biophys.* 430 (2004) 70-76.
- Bechoff, A., Dhuique-Mayer, C., Dornier, M., Tomlins, K.I., Boulanger, R., Dufour, D. y Westby, A. Relationship between the kinetics of β -carotene degradation and formation of norisoprenoids in the storage of dried sweet potato chips. *Food Chem.* 121 (2010) 348-357.
- Bechtel, D., Abecassis, J., y Shewry, P.R. (2009). The development, structure and mechanical properties of the wheat grain. En "Wheat: chemistry and technology, fourth ed." Khan, K., Shewry, P.R. (Eds.), AACC, St Paul, MN, USA, pp. 51-95.
- Belefant-Miller, H. y Grace, S.C. Variations in bran carotenoid levels within and between rice subgroups. *Plant Foods Hum. Nutr.* 65 (2010) 358-363.
- Beleggia, R., Platani, C., Nigro, F. y Cattivelli, L. A micro-method for the determination of yellow pigment content in durum wheat. *J. Cereal Sci.* 52 (2010) 106-110.
- Beleggia, R., Platani, C., Nigro, F. y Papa, R. Yellow pigment determination for single kernels of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) *Cereal Chem.* 88 (2011) 504-508.
- Bendich, A. y Olson, J.A. Biological actions of carotenoids. *FASEB J.* 3 (1989) 1927-1932.
- Berardo, N., Brenna, O. V., Amato, A., Valoti, P., Pisacane, V. y Motto, M. Carotenoids concentration among maize genotypes measured by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *Innov. Food Sci. Emerg.* 5 (2004) 393-398.
- Berardo, N., Manzzinelli, G., Valoti, P., Lagaña, P. y Redaelli, R. Characterization of maize germplasm for the chemical composition of the grain. *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 2378-2384.
- Berguer, M. y Schneider, M.P. Lipases in organic solvents: The fatty acid chain length profile. *Biotechnol. Lett.* 13 (1991) 641-645.
- Beta, T., Nam, S., Dexter, J.E. y Sapiirstein, H.D. Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions. *Cereal Chem.* 82 (2005) 390-393.
- Beyer, P. Golden Rice and 'Golden' crops for human nutrition. *New Biotechnol.* 27 (2010) 478-481.
- Beyer, P., Al-Babili, S., Ye, X., Lucca, P., Schaub, P., Welsch, R. y Potrykus, I. Golden rice: introducing the β -carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency. *J. Nutr.* 132 (2002) 506S-510S.

- Biacs, P., Daood, H.G., Pavisa, A. y Hajdu, F. Studies on the carotenoid pigments of paprika (*Capsicum annuum* L.Var Sz-20). *J. Agric. Food Chem.* 37 (1989) 350-353.
- Bilbao-Sáinz, C., Butler, M., Weaver, T. y Bent, J. Wheat starch gelatinization under microwave irradiation and conduction heating. *Carbohydr. Polym.* 69 (2007) 224-232.
- Biswall, B. Carotenoid catabolism during leaf senescence and its control by light. *J. Photoch. Photobio. B. Biol.* 30 (1995) 3-13.
- Blanco, A., Colasuonno, P., Gadaleta, A., Mangini, G., Schiavulli, A., Simeone, R., Digesù, A.M., De Vita, P., Mastrangelo, A.M. y Cattivelli, L. Quantitative trait loci for yellow pigment concentration and individual carotenoid compounds in durum wheat. *J. Cereal Sci.* 54 (2011) 255-264.
- Blanco, G., Frías, O., Garrido-Fernández, J. y Hornero-Méndez, D. Environmental-induced acquisition of nuptial plumage expression: a role of denaturalisation of feather carotenoproteins?. *P. Roy. Soc. B-Biol Sci.* 272 (2005) 1893-1900.
- Blessin, C.W. Carotenoids of corn and sorghum: I. Analytical procedure. *Cereal Chem.* 39 (1962) 236-242.
- Blessin, C.W., Brecher, J.D. y Dimler, R.J. Carotenoids of corn and sorghum: V. Distribution of xanthophylls and carotenes in hand-dissected and dry-milled fractions of yellow dent corn. *Cereal Chem.* 40 (1963) 582-590.
- Blessin, C.W., VanEtten, H. y Wiebe, R. Carotenoid content of the grain from yellow endosperm-type sorghums. *Cereal Chem.* 35 (1958) 359-365.
- Bone, R.A., Landrum, J.T. y Tarsis, S.L. Preliminary identification of the human macular pigment. *Vision Res.* 25 (1985) 1531-1535.
- Bone, R.A., Landrum, J.T., Dixon, Z., Chen, Y. y Llerena, C.M. Lutein and zeaxanthin in the eyes, serum and diet of human subjects. *Exp. Eye Res.* 71 (2000) 239-245.
- Bone, R.A., Landrum, J.T., Friedes, L.M., Gomez, C.M., Kilburn, M.D., Menéndez, E., Vidal, I. y Wang, W. Distribution of lutein and zeaxanthin stereoisomers in the human retina. *Exp. Eye Res.* 64 (1997) 211-218.
- Bone, R.A., Landrum, J.T., Hime, G.W., Cains, A. y Zamor, J. Stereochemistry of the human macular carotenoids. *Invest. Ophth. Vis. Sci.* 34 (1993) 2033-2040.
- Booker, J., Auldrige, M., Wills, S., McCarty, D., Klee, H. y Leyser, O. MAX3/CCD7 Is a carotenoid cleavage dioxygenase required for the synthesis of a novel plant signaling molecule. *Curr. Biol.* 14 (2004) 1232-1238.
- Bornscheuer, U.T. Lipase-catalyzed syntheses of monoacylglycerols. *Enzyme Microb. Technol.* 17 (1995) 578-586.
- Borrelli, G.M., De Leonardis, A.M., Fares, C., Platani, C. y Di Fonzo, N. Effects of modified processing conditions on oxidative properties of semolina dough and pasta. *Cereal Chem.* 80 (2003) 225-231.
- Borrelli, G.M., De Leonardis, A.M., Platani, C. y Troccoli, A. Distribution along durum wheat kernel of the components involved in semolina colour. *J. Cereal Sci.* 48 (2008) 494-502.
- Borrelli, G.M., Troccoli, A., Di Fonzo, N. y Fares, C. Durum wheat lipoxygenase activity and other quality parameters that affect pasta colour. *Cereal Chem.* 76 (1999) 335-340.
- Botella-Pavía, P., Besumbes, O., Phillips, M.A., Carretero-Paulet, L., Boronat, A. y Rodríguez-Concepción, M. Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors. *Plant J.* 40 (2004) 188-199.
- Bothmer, R.V. y Jacobsen, N. Origin, taxonomy, and related species. Barley, Agronomy Monograph 26 (1985) 19-56.
- Bouis, H.E., Chassy, B.M. y Ochanda, J.O. Genetically modified food crops and their contribution to human nutrition and food quality. *Trends Food Sci. Technol.* 14 (2003) 191-209.
- Bouis, H.E., Hotz, C., McClafferty, B., Meenakshi, J.V. y Pfeiffer, W. Biofortification: A new tool to reduce micronutrient malnutrition. *Food Nutr. Bull.* 32 (2011) S31-S40.
- Bouvier, F., d'Harlingue, A., Backhaus, R.A., Kumagai, M.H. y Camara, B. Identification of neoxanthin synthase as a carotenoid cyclase paralog. *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 6346-6352.

- Bouvier, F., d'Harlingue, A., Hugueney, P., Marin, E., Marion-Poll, A. y Camara, B. Xanthophyll Biosynthesis: cloning, expression, functional reconstitution, and regulation of b-cyclohexenyl carotenoid epoxidase from pepper (*Capsicum annuum*). *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 28861-67.
- Bouvier, F., Dogbo, O. y Camara, B. Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). *Science* 300 (2003) 2089-2091.
- Bouvier, F., Hugueney, P., d'Harlingue, A., Kuntz, M. y Camara, B. Xanthophyll biosynthesis in chromoplast: isolation and molecular cloning of an enzyme catalyzing the conversion of 5,6-epoxycarotenoid into ketocarotenoid. *Plant J.* 6 (1994) 45-54.
- Bouvier, F., Keller, Y., d'Harlingue, A. y Camara, B. Xanthophyll biosynthesis: molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (*Capsicum annuum* L.) *Biochim. Biophys. Acta* 1391 (1998) 320-328.
- Bouvier, F., Rahier, A. y Camara, B. Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Prog. Lipid. Res.* 44 (2005) 357-429.
- Bowen, P., Chen, L., Stacewicz-Sapuntzakis, M., Duncan, C., Sharifi, R., Ghosh, L., Kim, H., Christov-Tzelkov, K. y Van Breemen, R. Tomato sauce supplementation and prostate cancer: lycopene accumulation and modulation of biomarkers of carcinogenesis. *Exp. Biol. Med.* 227 (2002) 886-893.
- Bramley, P.M. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *J. Exp. Bot.* 53 (2002) 2107-2113.
- Bramley, P.M. The *in vitro* biosynthesis of carotenoids. *Adv. Lipid Res.* 21 (1985) 243-279.
- Brandolini, A., Hidalgo, A. y Plizzari, L. Storage-induced changes in einkorn (*Triticum monococcum* L.) and breadwheat (*Triticum aestivum* L. ssp. *aestivum*) flours. *J. cereal Sci.* 51 (2010) 205-212.
- Bratt, C.E., Arvidsson, P., Carlsson, M. y Åkerlund, H. Regulation of violaxanthin de-epoxidase activity by pH and ascorbate concentration. *Photosynth. Res.* 45 (1995) 169-175.
- Breithaupt, D.E. y Bamedi, A. Carotenoid esters in vegetables and fruits: a screening with emphasis on beta-cryptoxanthin esters. *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 2064-2070.
- Breithaupt, D.E. y Schwack, W. Determination of free and bound carotenoids in paprika (*Capsicum annuum* L.) by LC/MS. *Eur. Food Res. Technol.* 211 (2000) 52-55.
- Breithaupt, D.E., Wirt, U. y Bamedi, A. Differentiation between lutein monoester regioisomers and detection of lutein diesters from marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) and several fruits by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 66-70.
- Brites, C.M., Haros, M.J., Trigo, M.E. y Islas, R.P. (2007a). Maiz. En "De tales panes tales harinas", León, A.E. y Rosell, C.M. (Eds.), Hugo Báez (Editorial) Córdoba (Argentina), Cap. 2, pag. 73-122.
- Brites, C.M., Igrejas, G. y León, A.E. (2007b). Centeno y Triticale. En "De tales panes tales harinas". León, A.E. y Rosell, C.M. (Eds.), Hugo Báez (Editorial), Córdoba (Argentina), Cap. 4, pag. 161-194.
- Britton, G. (1995). UV/visible spectroscopy. En "Carotenoids, vol 1B: Spectroscopy". Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (Eds). Birkhäuser, Basel, pp. 13-62.
- Britton, G. (1998). Overview on carotenoid biosynthesis. En "Carotenoids, vol. 3: Biosynthesis". Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (Eds). Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 13-147.
- Britton, G. General carotenoid methods. *Method Enzymol.* 111 (1985) 113-149.
- Britton, G. y Hornero-Méndez, D. (1997). Carotenoids and colour in fruit and vegetables. En "Phytochemistry of Fruit and Vegetables". Tomás-Barberán, F.A. y Robins, R.J. (Eds.), Clarendon Press, Oxford (United Kingdom), Cap. 2, pag. 11-27.
- Britton, G. y Khachik, F. (2009). Carotenoids in Food. En "Carotenoids, vol 5: Nutrition and Health". Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (eds.). Birkhäuser Verlag Basel, pp. 45-66.
- Britton, G., Gambelli, L., Dunphy, P., Pudney, P. y Gidley, M. (2002). Physical state of carotenoids in chromoplasts of tomato and carrot: Consequences for bioavailability. En "Proceedings of the 2nd International Congress on Pigments in Food - Functionalities of pigments in food. J.A. Empis (ed). Lisboa, 11-14 junio.

- Britton, G., Liaaen-Jensen, S. y Pfander, H. Carotenoids - Handbook. (2004). Birkhäuser, Verlag Basel.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., & Pfander, H. (2009). Carotenoids. Volume 5: Nutrition and Health. Basel: Birkhäuser Verlag.
- Büch, K., Stransky, H. y Hager, A. FAD is a further essential cofactor of the NAD(P)H and O₂-dependent zeaxanthin-epoxidase. *FEBS Lett.* 376 (1995) 45-48.
- Burkhardt, P.K., Beyer, P., Wünn, J., Klöti, A., Armstrong, G.A., Schledz, M., Lintig, J.V. y Potrykus, I. Transgenic rice (*Oryza sativa*) endosperm expressing daffodil (*Narcissus pseudonarcissus*) phytoene synthase accumulates phytoene, a key intermediate of provitamin A biosynthesis. *Plant J.* 11 (1997) 1071-1078.
- Burkhardt, S. y Böhm, V. Development of a new method for the complete extraction of carotenoids from cereals with special reference to durum wheat (*Triticum durum* Desf.) *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 8295-8301.
- Burri, B.J. Beta-carotene and human health: A review of current research. *Nutr. Res.* 17 (1997) 547-580.
- Burt, A., Grainger, C., Young, J., Shelp, B. y Lee, E. Impact of postharvest handling on carotenoid concentration and composition in high-carotenoid maize (*Zea mays* L.) kernels. *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 8286-8292.
- Busch, M., Seuter, A. y Hain, R. Functional analysis of the early steps of carotenoid biosynthesis in tobacco. *Plant. Physiol.* 128 (2002) 439-453.
- Caballero, P.A., Gómez, M. y Rosell, C. M. Improvement of dough rheology, bread quality and bread shelf-life by enzymes combination. *J. Food Eng.* 81 (2007b) 42-53.
- Caballero, P.A., Gómez, M. y Rosell, C.M. Bread quality and dough rheology of enzyme-supplemented wheat flour. *Eur. Food Res. Technol.* 224 (2007a) 525-534.
- Calucci, L., Capocchi, A., Galleschi, L., Ghiringhelli, S., Pinzino, C., Saviozzi, F. y Zandomenighi, M. Antioxidants, free radicals, storage proteins, puroindolines, and proteolytic activities in bread wheat (*Triticum aestivum*) seeds during accelerated aging. *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 4274-4281.
- Calvo, M.M. Lutein: a valuable ingredient of fruit and vegetables. *Crit. Rev. Food. Sci.* 45 (2005) 1-26.
- Caprioli, I., Lafuente, M.T., Rodrigo, M.J. y Mencarelli, F. Influence of postharvest treatments on quality, carotenoids, and abscisic content of storage "Spring Belle" peach (*Prunus persica*) fruit. *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 7056-7063.
- Carbonell, J.V., Piñaga, F., Yusá, V. y Peña, J.L. The dehydration of paprika with ambient and heated air and the kinetics of colour degradation during storage. *J. Food Eng.* 5 (1986) 179-193.
- Carnevale, J., Cole, E.R. y Crank, G. Fluorescent light catalyzed autoxidation of β -carotene. *J. Agric. Food Chem.* 27 (1979) 462-463.
- Carol, P. y Kuntz, M. A plastid terminal oxidase comes to Light: implications for carotenoid biosynthesis and chlororespiration. *Trends Plant Sci.* 6 (2001) 31-36.
- Carrera, A., Echenique, V., Zhang, W., Helguera, M., Manthey, F., Schrager, A., Picca, A., Cervigni, G. y Dubcovsky, J. A deletion at the *Lpx-B1* locus is associated with low lipoxygenase activity and improved pasta color in durum wheat (*Triticum turgidum* ssp. *durum*) *J. Cereal Sci.* 45 (2007) 67-77.
- Carretero-Paulet, L., Ahumada, I., Cunillera, N., Rodríguez-Concepción, M., Ferrer, A., Boronat, A. y Campos, N. Expression and molecular analysis of the Arabidopsis DXR gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway. *Plant. Physiol.* 129 (2002) 1581-1591.
- Carretero-Paulet, L., Cairó, A., Botella-Pavía, P., Besumbe, O., Campos, N., Boronat, A. y Rodríguez-Concepción, M. Enhanced flux through the methylerythritol 4-phosphate pathway in *Arabidopsis* plants overexpressing deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase. *Plant Mol. Biol.* 62 (2006) 683-695.
- Cazzonelli, C.I. Carotenoids in nature: insights from plants and beyond. *Funct. Plant Biol.* 38 (2011) 833-847.

- Cazzonelli, C.I. y Pogson, B.J. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci.* 15 (2010) 266-274.
- Cazzonelli, C.I., Cuttriss, A.J., Cosetto, S.B., Pye, W., Crisp, P., Whelan, J., Finnegan, E.J., Turnbull, C. y Pogson, B.J. Regulation of carotenoid composition and shoot branching in *Arabidopsis* by a chromatin modifying histone methyltransferase, SDG8. *Plant Cell* 21 (2009a) 39-53.
- Cazzonelli, C.I., Millar, T., Finnegan, E.J. y Pogson, B.J. Promoting gene expression in plants by permissive histone lysine methylation. *Plant Signal. Behav.* 4 (2009b) 484-488.
- Cazzonelli, C.I., Roberts, A.C., Carmody, M.E. y Pogson, B.J. Transcriptional control of set domain group8 and carotenoid isomerase during *Arabidopsis* development. *Mol. Plant* 3 (2010) 174-191.
- Cazzonelli, C.I., Yin, K. y Pogson, B.J. Potential implications for epigenetic regulation of carotenoid biosynthesis during root and shoot development. *Plant Signal. Behav.* 4 (2009c) 339-341.
- Cerón-García, M., Campos-Pérez, I., Macías-Sánchez, M., Bermejo-Román, R., Fernández-Sevilla, J. y Molina-Grima, E. Stability of carotenoids in *Scenedesmus almeriensis* biomass and extracts under various storage conditions. *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 6944-6950.
- Chander, S., Guo, Y.Q., Yang, X.H., Zhang, J., Lu, X.Q., Yan, J.B., Song, T.M., Rocheford, T.R. y Li, J.S. Using molecular markers to identify two major loci controlling carotenoid contents in maize grain. *Theor. Appl. Genet.* 116 (2008b) 223-233.
- Chander, S., Meng, Y., Zhang, Y., Yan, J. y Li, J. Comparison of nutritional traits variability in selected eighty-seven inbreds from Chinese maize (*Zea mays* L.) germplasm. *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008a) 6506-6511.
- Chandler, L.A. y Schwartz, S.J. HPLC separation of cis-trans carotene isomers in fresh and processed fruits and vegetables. *J. food Sci.* 52 (1987) 669-672.
- Cheftel, J.C. Nutritional effects of extrusion-cooking. *Food Chem.* 20 (1986) 263-283.
- Chelkowski, J (1991). Cereal grain. Mycotoxins, fungi and quality in drying and storage. Developments in food Science. Elsevier, Amsterdam.
- Chen, B.H. y Tang, Y.C. Processing and stability of carotenoid powder from carrot pulp waste. *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 2312-2318.
- Chen, B.H., Peng, H.Y. y Chen, H.E. Changes of carotenoids, color, and vitamin A contents during processing of carrot juice. *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995) 1912-1918.
- Chen, F., He, Z.H., Xia, X.C., Xia, L.Q., Zhang, X.Y., Lillemo, M. y Morris, C.F. Molecular and biochemical characterization of puroindoline a and b alleles in chinese landraces and historical cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 112 (2006) 400-409.
- Chen, Y., Li, F. y Wurtzel, E.T. Isolation and characterization of the Z-ISO gene encoding a missing component of carotenoid biosynthesis in plants. *Plant Physiol.* 153 (2010) 66-79.
- Chirinos, R., Campos, D., Arbizu, C., Rogez, H., Rees, J., Larondelle, Y., Noratto, G. y Cisneros-Zeballos, L. Effect of genotype, maturity stage and post-harvest storage on phenolic compounds, carotenoid content and antioxidant capacity, of Andean mashua tubers (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón). *J. Sci. Food Agric.* 87 (2007) 437-446.
- Choe, E., Lee, J., Park, K. y Lee, S. Effects of heat pretreatment on lipid and pigments of freeze-dried spinach. *J. Food Sci.* 66 (2001) 1074-1079.
- Choi, Y., Jeong, H. y Lee, J. Antioxidant activity of methanolic extracts from some grains consumed in Korea. *Food Chem.* 103 (2007) 130-138.
- Chung, O.K., Ohm, J., Ram, M.S., Park, S. y Howitt, C.A. (2009). Wheat lipids. En "Wheat: Chemistry and Technology Fourth Edition". Khan, K., Shewry, P.R. (Eds.). AACCI International, Inc. St. Paul, Minnesota, U.S.A. Cap 10, pp. 363-399.
- Clarke, F.R., Clarke, J.M., McCaig, T.N., Knox, R.E. y Depauw, R.M. Inheritance of yellow pigment concentration in seven durum wheat crosses. *Can. J. Plant Sci.* 86 (2006) 133-141.
- Clarke, P.A., Barnes, K.A., Startin, J.R., Ibe, F.I. y Shepherd, M.J. High performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for the determination of carotenoids. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10 (1996) 1781-1785.
- Clayton, T.A. y Morrison, W.R. Changes in flour lipids during the storage of wheat flour. *J. Sci. Food Agric.* 23 (1972) 721-736.

- Collar, C. (2007) Cereales menores: Avena, Sorgo, Mijo. En "De tales panes tales harinas", León, A. E. y Rosell, C. M. (Eds), Hugo Báez (Editorial), Córdoba (Argentina), Cap 5, pag. 195-242.
- Comai, L. y Henikoff, S. TILLING: practical single-nucleotide mutation discovery. *Plant J.* 45 (2006) 684-694.
- Cong, L., Wang, C., Chen, L., Liu, H., Yang, G. y He, G. Expression of *phytoene synthase 1* and carotene desaturase *crtI* genes result in an increase in the total carotenoids content in transgenic elite wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Agric. Food. Chem.* 57 (2009) 8652-8660.
- Cooper, D.A., Eldridge, A.L. y Peters, J.C. Dietary carotenoids and certain cancers, heart disease, and age-related macular degeneration: A review of recent research. *Nutr. Rev.* 57 (1999) 201-214.
- Corona, V., Aracri, B., Kosturkova, G. Bartley, G.E., Pitto, L., Giorgetti, L., Scolnik, P.A. y Giuliano, G. Regulation of a carotenoide biosynthesis gene promoter during plant development. *Plant J.* 9 (1996) 505-512.
- Cortés, C., Torregrosa, F., Esteve, M. J. y Frígola, A. Carotenoid profile modification during refrigerated storage in untreated and pasteurized orange juice and orange juice treated with high-intensity pulsed electric fields. *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 6247-6254.
- Craft, N.E. y Soares, J.H. Relative solubility, stability, and absorptivity of lutein and β -carotene in organic solvents. *J. Agric. Food Chem.* 40 (1992) 431-434.
- Craft, N.E. y Wise, S.A. Individual carotenoid content of SRM 1548 total diet and influence of storage temperature, lyophilization, and irradiation on dietary carotenoids. *J. Agric. Food Chem.* 41 (1993) 208-213.
- Cristobal, J.A.R. Variation of the content of carotenes in cereals in relation to the time of storage. *An. Inst. Invest. Vet.* 15 (1965) 85-92.
- Cunningham, F.X. Regulation of carotenoid synthesis and accumulation in plants. *Pure Appl. Chem.* 74 (2002) 1409-1417.
- Cunningham, F.X. y Gantt, E. A study in Scarlet: enzymes of ketocarotenoid biosynthesis in the flowers of *Adonis aestivalis*. *Plant J.* 41 (2005) 478-492.
- Cunningham, F.X. y Gantt, E. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49 (1998) 557-83.
- Cunningham, F.X. y Gantt, E. One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by lycopene epsilon-cyclases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 2905-2910.
- Cunningham, F.X., Pogson, B., Sun, Z., McDonald, K.A., DellaPenna, D. y Gantt, E. Functional analysis of the β and ϵ lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell* 8 (1996) 1613-1626.
- Cuttriss, A. J., Cazzonelli, C.I., Wurtzel, E.T. y Pogson, B.J. Carotenoids. *Adv. Bot. Res.* 58 (2011) 1-36.
- Cuttriss, A.J., Mimica, J.L., Howitt, C.A. y Pogson, B.J. (2007b). Carotenoids. En "The structure and function of plastids". Wise, R.R., Hooper, J.K. (Eds.). Springer, cap. 16, pp. 315-334.
- Cuttriss, A.J., Chubb, A.C., Alawady, A., Grimm, B. y Pogson, B.J. Regulation of lutein biosynthesis and prolamellar body formation in *Arabidopsis*. *Funct. Plant Biol.* 34 (2007a) 663-672.
- Czeczuga, B. ketocarotenoids-Autumn carotenoids in *Metasequoia glyptostroboides*. *Biochem. Syst. Ecol.* 15 (1987) 303-306.
- Datta, K., Rai, M., Parkhi, V., Oliva, N., Tan, J. y Datta, S.K., Improved "Golden" rice and post-transgeneration enhancement of metabolic target products of carotenoids (β -carotene) in transgenic elite cultivars (IR64 and BR29). *Curr. Sci.* 91 (2006) 935-939.
- Datta, S.K., Datta, K., Parkhi, V., Rai, M., Baisakh, N., Sahoo, G., Rehana, S., Bandyopadhyay, A., Alamgir, Md., Ali, Md. S., Abrigo, E., Oliva, N. y Torrizo, L. Golden rice: introgression, breeding, and field evaluation. *Euphytica* 154 (2007) 271-278.
- Davies, B.H. Carotenoids. En "Chemistry and biochemistry of plant pigments". Goodwin, T.W., Ed.; Academic Press: London, 1976; Vol. 2, Chapter 19.
- Davies, B.H. y Köst, H.P. Carotenoids. En "Handbook of Chromatography". Köst, H.P., Ed.; CRC Press: Boca Raton, 1988; pp 93-117.

- Davison, P.A., Hunter, C.N. y Horton, P. Overexpression of beta-carotene hydroxylase enhances stress tolerance in *Arabidopsis*. *Nature* 418 (2002) 203-206.
- Davuluri, G.R., Tuinen, A.V., Fraser, P.D., Manfredonia, A., Newman, R., Burgess, D., Brummell, D.A., King, S.R., Palys, J., Uhlig, J., Bramley, P.M., Pennings, H.M.J. y Bowler, C. Fruit-specific RNAi-mediated suppression of *DET1* enhances carotenoid and flavonoid content in tomatoes. *Nat. Biotechnol.* 23 (2005) 890-895.
- De Oliveira, G. y Rodriguez-Amaya, D. Processed and prepared corn products as sources of lutein and zeaxanthin: compositional variation in the food chain. *J. Food Sci.* 72 (2007) S79-S85.
- De Simone, V., Menzo, V., De Leonardis, A.M., Ficco, D.B.M., Trono, D., Cattivelli, L. y De Vita, P. Different mechanisms control lipoxygenase activity in durum wheat kernels. *J. Cereal Sci.* 52 (2010) 121-128.
- Delcour, J.A. y Hoseney, R.C. (2010). Structure of cereals. En "Principles of Cereal Science and Technology, third edition". Delcour, J.A., Hoseney, R.C. (Eds.) AACC International, Inc. St. Paul, Minnesota, U.S.A. Cap 1, pp. 1-22.
- DellaPenna, D. y Pogson, B.J. Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Ann. Rev. Plant Biol.* 57 (2006) 711-738.
- Demeke, T., Chang, H.G. y Morris, C.F. Effect of germination, seed abrasion and seed size on polyphenol oxidase assay activity in wheat. *Plant Breeding* 120 (2001) 369-373.
- Dharmapuri, S., Rosatia, C., Pallara, P., Aquilani, R., Bouvier, F., Camara, B. y Giuliano, G. Metabolic engineering of xanthophyll content in tomato fruits. *FEBS Lett.* 519 (2002) 30-34.
- Dhuique-Mayer, C., Tbatou, M., Carail, M., Caris-Veyrat, C. Dornier, M. y Amiot, M.J. Thermal degradation of antioxidant micronutrients in citrus juice: kinetics and newly formed compounds. *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 4209-4216.
- Di Silvestro, R., Marotti, LL., Bosi, S., Bregola, V., Segura-Carretero, A., Sedej, I., Mandic, A., Sakac, M., Benedettelli, S. y Dinelli, G. Health-promoting phytochemicals of italian common wheat varieties grown under low-input agricultural management. *J. Sci. Food Agric.* 92 (2012) 2800-2810.
- Dibari, B., Murat, F., Chosson, A., Gautier, V., Poncet, C., Lecomte, P., Mercier, I., Bergés, H., Pont, C., Blanco, A. y Salse, J. Deciphering the genomic structure, function and evolution of carotenogenesis related phytoene synthases in grasses. *BMC Genomics* 13 (2012) 221.
- Digesù, A.M., Platani, C., Cattivelli, L., Mangini, G. y Blanco, A. Genetic variability in yellow pigment components in cultivated and wild tetraploid wheats. *J. Cereal Sci.* 50 (2009) 210-218.
- Diretto, G., Tavazza, R., Welsch, R., Pizzichini, D., Mourgues, F., Papacchioli, V., Beyer, P. y Giuliano, G. Metabolic engineering of potato tuber carotenoids through tuber-specific silencing of lycopene epsilon cyclase. *BMC Plant Biol.* 6 (2006) 13.
- Doblado-Maldonado, A.F., Pike, O.A., Sweley, J.C. y Rose, D.J. Key issues and challenges in whole wheat flour milling and storage. *J. Cereal Sci.* 56 (2012) 119-126.
- Dogbo, O. y Camara, B. Purification of isopentenyl pyrophosphate isomerase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum* chromoplast and affinity chromatography. *Biochem. Biophys. Acta* 920 (1987) 140-148.
- Dogbo, O., Laferrière, A., D'Harlingue, A. y Camara, B. Carotenoid biosynthesis: isolation and characterization of a bifunctional enzyme catalyzing the synthesis of phytoene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 7054-58.
- Ducreux, L.J.M., Morris, W.L., Hedley, P.E., Davies, H.V., Millan, S. y Taylor, M.A. Metabolic engineering of high carotenoid potato tubers containing enhanced levels of β -carotene and lutein. *J. Exp. Bot.* 56 (2005) 81-89.
- Dvorak, J., Luo, M.C., Yang, Z.L. y Zhang, H.B. The structure of the *Aegilops tauschii* genepool and the evolution of hexaploid wheat. *Theor. Appl. Genet.* 97 (1998) 657-670.
- Egesel, C.O., Wong, J.C., Lambert, R.J. y Rocheford, T.R. Combining ability of maize inbreds for carotenoids and tocopherols. *Crop Sci.* 43 (2003) 818-823.
- El-Agamey, A. y McGarvey, D.J. (2008). Carotenoid Radicals and Radical Ions. En "Carotenoids, vol 4: Natural Functions". Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (eds.) Birkhäuser Verlag Basel, pp. 119-154.

- Emter, O., Falk, H. y Sitte, P. Specific carotenoids and proteins as prerequisites for chromoplast tubule formation. *Protoplasma* 157 (1990) 128-135.
- Enfissi, E.M.A., Fraser, P.D., Lois, L.M., Boronat, A., Schuch, W. y Bramley, P.M. Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of healthpromoting isoprenoids in tomato. *Plant Biotechnol. J.* 3 (2005) 17-27.
- Erdman, J.W., Bierer, T.L. y Gugger, E. Absorption and transport of carotenoids. *Ann. NY. Acad. Sci.* 691 (1993) 76-85.
- Estévez, J.M., Cantero, A., Reindl, A., Reichler, S. y León, P. 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 22901-22909.
- Eugster, C.H. (1995). Chemical derivatization: microscale tests for the presence of common functional groups in carotenoids. En "Carotenoids, vol 1A: Isolation and analysis". Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (Eds) Birkhäuser, Verlag Basel, pp. 71-80.
- Evers, A.D. y Redman, D.G. The location of proteolytic enzymes in developing grains of wheat. *Chem. Ind. (London)* 2 (1973) 90-91.
- Facella, P., Lopez, L., Carbone, F., Galbraith, D.W., Giuliano, G. y Perrotta, G. Diurnal and circadian rhythms in the tomato transcriptome and their modulation by cryptochrome photoreceptors. *Plos one* 3 (2008) e2798.
- FAO. <http://fao.org/>
- FAO/WHO Joint expert Committee on food additives. (1967) WHO Tech. Rep.Ser. 362.
- FAOSTAT. <http://faostat.fao.org/>
- Fardet, A., New hypotheses for the health-protective mechanisms of whole-grain cereals: what is beyond fibre? *Nutr. Res. Rev.* 23 (2010) 65-134.
- Fardet, A., Rock, E. y Rémésy, C. Is the *in vitro* antioxidant potencial of whole-grain cereals and cereal products well reflected *in vivo*? *J. Cereal Sci.* 48 (2008) 258-276.
- Fares, C., Codianni, P., Nigro, F., Platani, C., Scazzina, F. y Pellegrini, N. Processing and cooking effects on chemical, nutritional and functional properties of pasta obtained from selected emmer genotypes. *J. Sci. Food Agric.* 88 (2008) 2435-2444.
- Farré, G., Ramessar, K., Twyman, R.M., Capell, T. y Christou, P. The humanitarian impact of plant biotechnology: recent breakthroughs vs bottlenecks for adoption. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13 (2010b) 219-225.
- Farré, G., Sanahuja, G., Naqvi, S., Bai, C., Capell, T., Zhu, C. y Christou, P. Travel advice on the road to carotenoids in plants. *Plant Sci.* 179 (2010a) 28-48.
- Farrington, W.H.H., Warwick, M.J. y Shearer, G. Changes in the carotenoids and sterol fractions during the prolonged storage of wheat flour. *J. Sci. Food Agric.* 32 (1981) 948-950.
- Febles, C.I., Arias, A., Hardisson, A., Rodríguez-Alvarez, C. y Sierra, A. Phytic acid level in wheat flours. *J. Cereal Sci.* 38 (2002) 19-23.
- Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., Jarén-Galán, M., Garrido-Fernández, J., Pérez-Gálvez, A. y Hornero-Méndez, D. Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. *Food Res. Int.* 46 (2012) 438-450.
- Ferreira, J.E.M. y Rodriguez-Amaya, D.B. Degradation of lycopene and β -carotene in model systems and in lyophilized guava during ambient storage: kinetics, structure, and matrix effects. *J. Food Sci.* 78 (2008) 589-594.
- Feuillet, C., Landgridge, P. y Waugh, R. Cereal breeding takes a walk on the wild side. *Trends Genet.* 24 (2007) 24-32.
- Feussner, I., Kühn, H., Wasternack, C. Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. *Trends Plant Sci.* 6 (2001) 268-273.
- Fiedor, L., Rosenbach-Belkin, V. y Scherz, A. The stereospecific interaction between chlorophylls and chlorophyllase: possible implication for chlorophyll biosynthesis and degradation. *J.Biol. Chem.* 267 (1992) 22043-22047.
- Figoni, P. (2008). Wheat flour. En "How baking works: exploring the fundamentals of baking science", Willey, J. y Sons (Eds.), Willey, New jersey (EEUU), Cap. 5, pag. 67-69.

- Fish, W.W. y Davis, A.R. The effects of frozen storage conditions on lycopene stability in watermelon tissue. *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 3582-3585.
- Flint-Garcia, S.A., Thornsberry, J.M., Edward, S. y Buckler IV. Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54 (2003) 357-374.
- Flores-Pérez, U., Sauret-Güeto, S., Gas, E., Jarvis, P., Rodríguez-Concepción, M. A mutant impaired in the Production of plastome-encoded proteins uncovers a mechanism for the homeostasis of isoprenoid biosynthetic enzymes in Arabidopsis plastids. *Plant Cell* 20 (2008) 1303-1315.
- Foolad, M.R. Genome mapping and molecular breeding of tomato. *Int. J. Plant Genomics* volume (year) 2007, 52 pages.
- Foppen, F.H. Tables for identification of carotenoid pigments. *Chromatogr. Rev.* 14 (1971) 133-298.
- Frank, H.A. y Cogdell, R.J. Carotenoids in photosynthesis. *Photochem. Photobiol.* 63 (1996) 257-264.
- Fraser, P.D. y Bramley, P.M. (2009). Genetic manipulation of carotenoid content and composition in crop plants. En "Carotenoids, vol 5: Nutrition and Health". Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (eds.) Birkhäuser, Basel, pp. 99-114.
- Fraser, P.D. y Bramley, P.M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog. Lipid. Res.* 43 (2004) 228-265.
- Fraser, P.D., Enfissi, E.M.A., Halket, J.M., Truesdale, M.R., Yu, D., Gerrish, C. y Bramley, P.M. Manipulation of phytoene levels in tomato fruit: effects on isoprenoids, plastids, and intermediary metabolism. *Plant Cell* 19 (2007) 3194-3211.
- Fraser, P.D., Kiano, J.W., Truesdale, M.R., Schuch, W. y Bramley, P.M. Phytoene synthase-2 enzyme activity in tomato does not contribute to carotenoid synthesis in ripening fruit. *Plant Mol. Biol.* 40 (1999) 687-698.
- Fraser, P.D., Romer, S., Shipton, C.A., Mills, P.B., Kiano, J.W., Misawa, N., Drake, R.G., Schuch, W. y Bramley, P.M. Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 1092-1097.
- Fraser, P.D., Schuch, W. y Bramley, P.M. Phytoene synthase from tomato (*Lycopersicon esculentum*) chloroplasts- partial purification and biochemical properties. *Planta* 211 (2000) 361-369.
- Fraser, P.D., Truesdale, M.R., Bird, C.R., Schuch, W. y Bramley, P.M. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: Evidence for tissue-specific gene expression. *Plant Physiol.* 105 (1994) 405-413.
- Fратиanni, A., Di Criscio, T., Mignogna, R. y Panfili, G. Carotenoids, tocots and retinols evolution during egg pasta-making processes. *Food Chem.* 131 (2012) 590-595.
- Fратиanni, A., Irano, M., Panfili, G. y Acquistucci, R. Estimation of color of durum wheat. Comparison of WSB, HPLC, and reflectance colorimeter measurements. *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 2373-2378.
- Fray, R.G., Wallace, A., Fraser, P.D., Valero, D., Hedden, P., Bramley, P.M. y Grierson, D. Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellins pathway. *Plant J.* 8 (1995) 693-701.
- Fray, R.G. y Grierson, D. Identification and genetic analysis of normal and mutant phytoene synthase genes of tomato by sequencing, complementation and co-suppression. *Plant Mol. Biol.* 22 (1993) 589-602.
- Frei, M. y Becker, K. Fatty acids and all-trans- β -carotene are correlated in differently colored rice landraces. *J. Sci. Food Agric.* 85 (2005) 2380-2384.
- Frey, A., Boutin, J., Sotta, B., Mercier, R., Marion-Poll, A. Regulation of carotenoid and ABA accumulation during the development and germination of *Nicotiana plumbaginifolia* seeds. *Planta* 224 (2006) 622-632.
- Fu, B.X., Schlichting, L., Pozniak, C.J. y Singh, A.K. Pigment loss from semolina to dough: rapid measurement and relationship with pasta colour. *J. cereal Sci.* 57 (2013) 560-566.
- Fu, H., Xie, B., Fan, G., Ma, S., Zhu, X. y Pan, S. Effect of esterification with fatty acid of β -cryptoxanthin on its thermal stability and antioxidant activity by chemiluminescence method. *Food Chem.* 122 (2010) 602-609.

- Fu, X., Kong, W., Peng, G., Zhou, J., Azam, M., Xu, C., Grierson, D. y Chen, K. Plastid structure and carotenogenic gene expression in red- and white-fleshed loquat (*Eriobotrya japonica*) fruits. *J. Exp. Bot.* 63 (2012) 341-354.
- Fukushima, A., Kusano, M., Nakamichi, N., Kobayashi, M., Hayashi, N., Sakakibara, H., Mizuno, T. y Saito, K. Impact of clock-associated Arabidopsis pseudo-response regulators in metabolic coordination. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 106 (2009) 7251-7256.
- Galante, A.A., Tiwari, R., Ammiraju, J.S.S., Santra, D.K., Lagu, M.D., Rao, V.S., Gupta, V.S., Misra, B.K., Nagarajan, S. y Ranjekar, P.K. Genetic analysis of kernel hardness in bread wheat using PCR-based markers. *Theor. Appl. Genet.* 103 (2001) 601-606.
- Gallagher, C.E., Matthews, P.D., Li, F. y Wurtzel, E.T. Gene duplication in the carotenoid biosynthetic pathway preceded evolution of the grasses. *Plant Physiol.* 135 (2004) 1776-1783.
- Galleschi, L., Capocchi, A., Ghiringhelli, S. y Saviozzi, F. Antioxidants, free radicals, storage proteins, and proteolytic activities in wheat (*Triticum durum*) seeds during accelerated aging. *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 5450-5457.
- Galliard, T. Hydrolytic and oxidative degradation of lipids during storage of wholemeal flour. Effects of bran and germ components. *J. Cereal Sci.* 4 (1986) 179-192.
- Galliard, T. (1994). Rancidity in cereal products. En "Rancidity in foods, third ed". Allen, J., Hamilton, R. (Eds.). Blackie Academic & Professional, London, pp. 141-159.
- Galpaz, N., Wang, Q., Menda, N., Zamir, D. y Hirschberg, J. Absciscic acid deficiency in the tomato mutant *high-pigment 3* leading to increased plastid number and higher fruit lycopene content. *Plant J.* 53 (2008) 717-730.
- Gandhi, N.N. Applications of lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74 (1997) 621-634.
- Garbe, L., Barbosa-De Almeida, R., Nagel, R., Wackerbauer, K. y Tressl, R. Dual positional and stereospecificity of lipoxygenase isoenzymes from germinating barley (Green Malt): biotransformation of free and esterified linoleic acid. *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 946-955.
- Garcés, R. y Mancha, M. One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues. *Anal. Biochem.* 211 (1993) 139-143.
- García-Limones C., Schnäbele K., Blanco-Portales, R., Luz Bellido M, Caballero, J.L., Schwab W. y Muñoz-Blanco J. Functional characterization of FaCCD1: a carotenoid cleavage dioxygenase from strawberry involved in lutein degradation during fruit ripening. *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 9277-9285.
- Garrett, D., Failla, M.L. y Sarama, R.J. Development of an in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 4301-4309.
- Gau, W., Ploschke, H.J., y Wünsche, C. Mass spectrometric identification of xanthophylls fatty acid esters from marigold flowers (*Tagetes erecta*) obtained by high-performance liquid chromatography and Craig counter-current distribution. *J. Chromatogr.* 262 (1983) 277-284.
- Gerjets, T. y Sandmann, G. Ketocarotenoid formation in transgenic potato. *J. Exp. Bot.* 57 (2006) 3639-3645.
- Giménez, M.J., Pistón, F. y Atienza, S.G. Identification of suitable reference genes for normalization of qPCR data in comparative transcriptomics analyses in the Triticeae. *Planta* 233 (2011) 163-173.
- Giuliano, G., Tavazza, R., Diretto, G., Beyer, P. y Taylor, M.A. Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Biotechnol.* 26 (2008) No.3.
- Glaser, T., Lienau, A., Zeeb, D., Krucker, M., Dachtler, M. y Albert, K. Qualitative and quantitative determination of carotenoid stereoisomers in a variety of spinach samples by use of MSPD before HPLC-UV, HPLC-APCI-MS, and HPLC-NMR on-line coupling. *Chromatographia*, 57 (2003) 19-25.
- Golberg, M., Thomas, D. y Legoy, M. Water activity as a key parameter of synthesis reactions: The example of lipase in biphasic (liquid/solid) media. *Enzyme Microb. Technol.* 12 (1990) 976-981.
- Goldman, M., Horev, B. y Saguy, I. Decolorization of β -carotene in model systems simulating dehydrated foods. Mechanism and kinetic principles. *J. Food Sci.* 48 (1983) 751-754.
- Golovnina, K.A., Glushkov, S.A., Blinov, A.G., Mayorov, L.R., Adkison, L.R. y Goncharov, N.P. Molecular phylogeny of the genus *Triticum* L. *Plant Syst. Evol.* 264 (2007) 195-216.

- Goodwin, T.W. (1976). Distribution of carotenoids. En "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, Vol. 1". Ed. Goodwin, T.W. Academic Press. London, New York and San Francisco. Pag. 225-257.
- Goodwin, T.W. (1980). The biochemistry of plant pigments, vol.1, Godwin, T.W. (Ed.), Chapman & Hall, London.
- Goupy, P., Hugues, M., Boivin, P. y Amiot, M.J. Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. *J. Sci. Food Agric.* 79 (1999) 1625-1634.
- Graham, R., Senadhira, D., Beebe, S., Iglesias, C. y Monasterio, I. Breeding for micronutrient density in edible portions of staple food crops: conventional approaches. *Field Crop Res.* 60 (1999) 57-80.
- Graham, R.D. y Rosser, J.M. Carotenoids in staple foods: their potential to improve human nutrition. *Food Nutr. Bull.* 21 (2000) 404-409.
- Graham, R.D., Humphries, J.M. y Kitchen, J.L. Nutritionally enhanced cereals: A sustainable foundation for a balanced diet. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 9 (2000) S91-S96.
- Granado-Lorencio, F., Olmedilla-Alonso, B., Herrero-Barbudo, C., Blanco-Navarro, I., Pérez-Sacristán, B. y Blázquez-García, S. *In vitro* bioaccessibility of carotenoids and tocopherols from fruits and vegetables. *Food Chem.* 102 (2007) 641-648.
- Grand Challenges in Global Health. www.grandchallenges.org/ImproveNutrition/Challenges/NutrientRichPlants/Pages/Sorghum.
- Gregory, G.K., Chen, T.S. y Philip, T. Quantitative analysis of lutein esters in marigold flowers (*Tagetes erecta*) by high performance liquid chromatography. *J. Food Sci.* 51 (1986) 1093-1094.
- Grela, E.R. Nutrient composition and content of antinutritional factors in Spelt (*Triticum spelta* L) cultivars. *J. Sci. Food Agric.* 71 (1996) 399-404.
- Griffiths, D. W., Dale, M.F.B., Morris, W. L. y Ramsay, G. Effects of season and postharvest storage on the carotenoid content of Solanum phureja potato tubers. *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 379-385.
- Gross, J. Pigments in fruits. Academic Press: London, 1987.
- Gross, J. Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids; Van Nostrand Reinhold: New York, 1991.
- Guevara-García, A., San Román, C., Arroyo, A., Cortés, M.E., Gutiérrez-Nava, M. y León, P. Characterization of the Arabidopsis clb6 mutant illustrates the importance of posttranscriptional regulation of the methyl-d-erythritol 4-phosphate pathway. *Plant Cell* 17 (2005) 628-643.
- Gupta, P.K., Varshney, P.K., Sharma, P.C. y Ramesh, B. Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breed.* 118 (1999) 369-390.
- Gutierrez-Gonzalez, J.J., Wise, M.L. y Garvin, D.F. A developmental profile of tocol accumulation in oat seeds. *J. Cereal Sci.* 57 (2013) 79-83.
- Gutierrez-Nava, M.L., Gillmor, C.S., Jimenez, L.F., Guevara-García, A. y Leon, P. Chloroplast biogenesis genes act cell and noncell autonomously in early chloroplast development. *Plant Physiol.* 135 (2004) 471-482.
- Guzman-Tello, R. y Cheftel, J.C. Colour loss during extrusion cooking of β -carotene-wheat flour mixes as an indicator of the intensity of thermal and oxidative processing. *Int. J. Food Sci. Technol.* 25 (1990) 420-434.
- Hagenimana, V., Carey, E.E., Gichuki, S.T., Oyunga, M.A. y Imungi, J.K. Carotenoid contents in fresh, dried and processed sweetpotato products. *Ecol. Food Nutr.* 37 (1998) 455-473.
- Hager, A. y Holocher, K. Localization of the xanthophyll-cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase within the thylakoid lumen and abolition of its mobility by a (light-dependent) pH decrease. *Planta* 192 (1994) 581-589.
- Handelman, G.J. The evolving role of carotenoids in human biochemistry. *Nutrition* 17 (2001) 818-822.
- Handelman, G.J., Dratz, E.A., Reay, C.C. y Van Kuijk, J.G.M. Carotenoids in the human macula and whole retina. *Invest. Ophth. Vis. Sci.* 29 (1988) 850-855.

- Hannoufa, A. y Hossain, Z. Regulation of carotenoid accumulation in plants. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 1 (2012) 198-202.
- Haralampu, S. G. y Karel, M. kinetic models for moisture dependence of ascorbic acid and β -carotene degradation in dehydrated sweet potato. *J. Food Sci.* 48 (1983) 1872-1873.
- Harjes, C.E., Rocheford, T.R., Bai, L., Brutnell, T.P., Bermudez-Kandianis, C., Sowinski, S.G., Stapleton, A.E., Vallabhaneni, R., Williams, M., Wurtzel, E.T., Yan, J. y Buckler, E.S. Natural genetic variation in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification. *Science* 319 (2008) 330-333.
- Harvestplus. Breeding Crops for Better Nutrition. <http://www.harvestplus.org/>.
- Hathcock, J.N. Vitamins and minerals: efficacy and safety. *Am. J. Clin. Nutr.* 66 (1997) 427-437.
- Havaux, M. y Niyogi, K.K. The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 8762-8767.
- Hellyer, S.A., Chandler, I.C. y Bosley, J.A. Can the fatty acid selectivity of plant lipases be predicted from the composition of the seed triglyceride? *Biochim. Biophys. Acta* 1440 (1999) 215-224.
- Hemery, Y., Rouau, X., Lullien-Pellerin, V., Barron, C. y Abecassis, J. Dry processes to develop wheat fractions and products with enhanced nutritional quality. *J. Cereal Sci.* 46 (2007) 327-347.
- Hennekens, C.H., Buring, J.E., Manson, J.E., Stampfer, M., Rosner, B., Cook, N.R., Belanger, C., LaMotte, F., Gaziano, J.M., Ridker, P.M., Willett, W. y Peto, R. Lack effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* 334 (1996) 1145-1149.
- Henry, L. K., Catignani, G. L. y Schwartz, S. J. Oxidative degradation kinetics of lycopene, lutein, and 9-cis and all-trans β -carotene. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75 (1998) 823-829.
- Hentschel, V., Kranl, K., Hollmann, J., Lindhauer, M.G., Bohm, V. y Bitsch, R. Spectrophotometric determination of yellow pigment content and evaluation of carotenoids by high-performance liquid chromatography in durum wheat grain. *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 6663-6668.
- Herchi, W., Sakouhi, F., Boukhchina, S., Kallel, H. y Pepe, C. Changes in fatty acids, tocopherols, carotenoids and chlorophylls content during flaxseed development. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 88 (2011) 1011-1017.
- Hernández, P., Barceló, P. y Cabrera, A. The effect of *Hordeum chilense* and *Triticum* cytoplasm on anther culture response of tritordeum. *Plant Cell Rep.* 20 (2001a) 542-546.
- Hernández, P., Dorado, G., Prieto, P., Giménez, M.J., Ramírez, M.C., Laurie, D.A., Snape, J.W. y Martín, A. A core genetic map of *Hordeum chilense* and comparisons with maps of barley (*Hordeum vulgare*) and wheat (*Triticum aestivum*). *Theor. Appl. Genet.* 102 (2001b) 1259-1264.
- Hessler, T.G., Thomson, M.J., Bensch, D., Nachit, M.M. y Sorrells, M.E. Association of a lipoxigenase locus, Lpx-B1, with variation in lipoxigenase activity in durum wheat seeds. *Crop Sci.* 42 (2002) 1695-1700.
- Hidalgo, A. y Brandolini, A. Kinetics of carotenoids degradation during the storage of einkorn (*Triticum monococcum* L. ssp. *monococcum*) and bread wheat (*Triticum aestivum* L. ssp. *aestivum*) flours. *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008b) 11300-11305.
- Hidalgo, A. y Brandolini, A. Protein, ash, lutein and tocopherols distribution in einkorn (*Triticum monococcum* L. ssp. *monococcum*) seed fractions. *Food Chem.* 107 (2008a) 444-448.
- Hidalgo, A. y Brandolini, A. Lipoxigenase activity in wholemeal flours from *Triticum monococcum*, *Triticum turgidum* and *Triticum aestivum*. *Food Chem.* 131 (2012) 1499-1503.
- Hidalgo, A., Brandolini, A. y Pompei, C. Carotenoids evolution during pasta, bread and water biscuit preparation from wheat flours. *Food Chem.* 121 (2010) 746-751.
- Hidalgo, A., Brandolini, A. y Ratti, S. Influence of genetic and environmental factors on selected nutritional traits of *Triticum monococcum*. *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009a) 6342-6348.
- Hidalgo, A., Brandolini, A., Pompei, C. y Piscozzi, R. Carotenoids and tocopherols of einkorn wheat (*Triticum monococcum* ssp. *monococcum* L.) *J. Cereal Sci.* 44 (2006) 182-193.
- Hidalgo, A., Brandolini, A., Pompei, C. y Piscozzi, R. Kinetics of tocopherols degradation during the storage of einkorn (*Triticum monococcum* L. ssp. *monococcum*) and bread wheat (*Triticum aestivum* L. ssp. *aestivum*). *Food Chem.* 116 (2009b) 821-827.

- Hieber, A.D., Bugos, R.C. y Yamamoto, H.Y. Plant lipocalins: violaxanthin de-epoxidase and zeaxanthin epoxidase. *Biochim. Biophys. Acta*. 1482 (2000) 84-91.
- Hildebrand, D.F. Lipoxygenases. *Physiol. Plant*. 76 (1989) 249-253.
- Hildebrand, D.F., Hamilton-Kemp, T.R., Loughrin, J.H., Ali, K. y Andersen, R.A. Lipoxygenase 3 reduces hexanal production from soybean seed homogenates. *J. Agric. Food Chem.* 38 (1990) 1934-1936.
- Hills, M.J. y Mukherjee, K.D. Triacylglycerol lipase from Rape (*Brassica napus* L.) suitable for biotechnological purposes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 26 (1989) 1-10.
- Hirschberg, J. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4 (2001) 210-218.
- Hirschberg, J., Cohen, M., Harker, M., Lotan, T., Mann, V. y Pecker, I. Molecular genetics of the carotenoid biosynthesis pathway in plants and algae. *Pure Appl. Chem.* 69 (1997) 2151-2158.
- Hirschi, K.D. Nutrient biofortification of food crops. *Annu. Rev. Nutr.* 29 (2009) 401-421.
- Holden, J.M., Eldridge, A.L., Beecher, G.R., Buzzard, M., Bhagwat, S., Davis, C.S., Douglass, L.W., Gebhardt, S., Haytowitz, D. y Schakel, S. Carotenoid content of U.S. foods: an update of the database. *J. Food Compos. Anal.* 12 (1999) 169-196.
- Honold, G.R. y Stahmann, M.A. The oxidation-reduction enzymes of wheat. IV. Qualitative and Quantitative investigations of the oxidases. *Cereal Chem.* 45 (1968) 99-108.
- Hornero-Méndez, D. y Britton, G. Involvement of NADPH in the cyclization reaction of carotenoid biosynthesis. *FEBS Lett.* 515 (2002) 133-136.
- Hornero-Méndez, D. y Mínguez-Mosquera M.I. Properties of chlorophyllase from *Capsicum annuum* L fruits. *Z Naturforsch C* 56 (2001) 1015-1021.
- Hornero-Méndez, D. y Mínguez-Mosquera, M. I. Xanthophyll esterification accompanying carotenoid overaccumulation in chromoplast of *Capsicum annuum* ripening fruits is a constitutive process and useful for ripeness index. *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 1617-1622.
- Hornero-Méndez, D. y Mínguez-Mosquera, M.I. Bioaccessibility of carotenes from carrots: effect of cooking and addition of oil. *Innov. Food Sci. Emerg.* 8 (2007) 407-412.
- Horsley, R.D., Franckowiak, J.D. y Schwarz, P.B. (2009) Barley. En "Cereals". Carena, M.J. (ed.), Springer Science + Business Media, LLC, Alemania, Cap. 7, pag. 227-250.
- Hörtensteiner, S. Chlorophyll degradation during senescence. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57 (2006) 55-77.
- Hörtensteiner, S. y Kräutler, B. Chlorophyll breakdown in higher plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1807 (2011) 977-988.
- Howitt, C.A. y Pogson, B.J. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant Cell Environ.* 29 (2006) 435-445.
- Howitt, C.A., Cavanagh, C.R., Bowerman, A.F., Cazzonelli, C., Rampling, L., Mimica, J.L. y Pogson, B.J. Alternative splicing, activation of cryptic exons and amino acid substitutions in carotenoid biosynthetic genes are associated with lutein accumulation in wheat endosperm. *Funct. Integr. Genomics* 9 (2009) 363-376.
- Hu, Q.P. y Xu, J.G. Profiles of carotenoids, anthocyanins, phenolics, and antioxidant activity of selected color waxy corn grains during maturation. *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 2026-2033.
- Huang, A.H.C., Lin, Y. y Wang, S. Characteristics and biosynthesis of seed lipases in maize and other plant species. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65 (1988) 897-899.
- Huber, L. y George, S. A. A review of: "Diode array detection in HPLC, Chromatographic Science Series, J. Cazes (Ed.) Volume 62, Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, Hongkong, 1993, ISBN: 042474947-4. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 17 (18) 1994.
- Hugueney, P., Badillo, A., Chen, H.C., Klein, A., Hirschberg, J., Camara, B. y Kuntz, M. Metabolism of cyclic carotenoids: a model for the alteration of the biosynthesis pathway in *Capsicum annuum* chromoplast. *Plant J.* 8 (1995) 417-424.
- Humeau, C., Rovel, B. y Girardin, M. Enzymatic esterification of bixin by L-ascorbic acid. *Biotechnol. Lett.* 22 (2000) 165-168.
- Humphries, J. y Khachik, F. Distribution of Lutein, Zeaxanthin, and related geometrical isomers in fruit, vegetables, wheat, and pasta products. *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 1322-1327.

- Humphries, J.M., Graham, R.D. y Mares, D.J. Application of reflectance colour measurement to the estimation of carotene and lutein content in wheat and triticale. *J. Cereal Sci.* 40 (2004) 151-159.
- Hunter, W.N. The non-mevalonate pathway of isoprenoid precursor biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 21573-21577.
- Ibrahim, K. y Juvik, J. Feasibility for improving phytonutrient content in vegetable crops using conventional breeding strategies: case study with carotenoids and tocopherols in sweet corn and broccoli. *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 4636-4644.
- ICC International Association for Cereal Science and Technology, Method 152. Determination of the yellow pigment content of durum wheat semolina and flour. (1990).
- International Conference on Harmonization. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. In Q2B(R1): Guideline on Validation of Analytical Procedure- Methodology; ICH Steering Committee: Brussels, Belgium, 2005.
- Isaacson, T., Ohad, I., Beyer, P. y Hirschberg, J. Analysis in vitro of the enzyme CRTISO establishes a poly-*cis*-carotenoid biosynthesis pathway in plants. *Plant Physiol.* 136 (2004) 4246-4255.
- Isaacson, T., Ronen, G., Zamir, D. y Hirschberg, J. Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of carotene and xanthophylls in plants. *Plant Cell* 14 (2002) 333-342.
- Ishikawa, M., Fujiwara, M., Sonoike, K y Sato, N. Orthogenomics of photosynthetic organisms: Bioinformatic and experimental analysis of chloroplast proteins of endosymbiont origin in Arabidopsis and their counterparts in *Synechocystis*. *Plant Cell Physiol.* 50 (2009) 773-788.
- IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry (CNOC) and IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN). Nomenclature of Carotenoids. *Pure Appl. Chem.* 41 (1974) 405-431.
- Jaaska, V. Aspartate Aminotransferase and alcohol dehydrogenase isoenzymes: intraspecific differentiation in *Aegilops tauschii* and the origin of the D genome polyploids in the wheat group. *Plant Syst. Evol.* 137 (1981) 259-273.
- Jaaska, V. Electrophoretic survey of seedling esterases in wheats in relation to their phylogeny. *Theor. Appl. Genet.* 56 (1980) 273-284.
- Jaaska, V. NADP-dependent aromatic alcohol dehydrogenase in polyploid wheats and their diploid relatives. On the origin and phylogeny of polyploid wheats. *Theor. Appl. Genet.* 53 (1978) 209-217.
- Jachmanián, I., Schulte, E. y Mukherjee, K.D. Substrate selectivity in esterification of less common fatty acids catalysed by lipases from different sources. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44 (1996) 563-567.
- Jacobsen, J.V., Pearce, D.W., Poole, A.T., Pharis, R.P. y Mander, L.N. Absciscic acid, phaseic acid and gibberellin contents associated with dormancy and germination in barley. *Physiol. Plant.* 115 (2002) 428-441.
- Janick-Buckner, D., Hammock, J.D., Johnson, J.M., Osborn, J.M. y Buckner, B. Biochemical and ultrastructural analysis of the y10 mutant of maize. *J. Hered.* 90 (1999) 507-513.
- Jarén-Galán y Mínguez-Mosquera, M. I. β -carotene and capsanthin co-oxidation by lipoxygenase. Kinetic and thermodynamic aspects of the reaction. *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 4814-4820.
- Jauhar, P.P. Spontaneous haploids in durum wheat: their cytogenetic characterization. *Euphytica* 148 (2006) 341-344.
- Jayaraj, J., Devlin, R. y Punja, Z. Metabolic engineering of novel Ketocarotenoid production in carrot plants. *Transgenic Res.* 17 (2008) 489-501.
- Jensen, R.G. Characteristics of the lipase from the Mold, *Geotrichum candidum*. A review. *Lipids* 9 (1974) 149-157.
- Johnston, R.A., Quick, J.S. y Hammond, J.J. Inheritance of semolina color in six durum wheat crosses. *Crop Sci.* 23 (1983) 607-610.
- Jones, R.J. y Brenner, M.L. Distribution of absciscic acid in maize kernel during grain filling. *Plant Physiol.* 83 (1987) 905-909.

- Jong, A., Plat, J. y Mensink, R.P. Metabolic effects of plant sterols and stanols (Review). *J. Nutr. Biochem.* 14 (2003) 362-369.
- Jood, S. y Kapoor, A.C. Vitamin contents of cereal grains as affected by storage and insect infestation. *Plant Food Hum Nutr.* 46 (1994) 237-243.
- Jørgensen, K. y Skibsted, L.H. Carotenoid scavenging of radicals. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 196 (1993) 423-429.
- Joyard, J., Ferro, M., Masselon, C., Seigneurin-Berny, D., Salvi, D., Garin, J. y Rolland, N. Chloroplast proteomics and the compartmentation of plastidial isoprenoid biosynthetic pathways. *Mol. Plant* 2 (2009) 1154-1180.
- Juliano, B.O. (1994). Rice: chemistry and technology, Juliano, B.O. (ed.), 2nd ed., St. Paul, EUA, pp 17-160 y 647-680.
- Julliard, J.H. y Douce, R. Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin (vitamin B1) in higher plant chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88 (1991) 2042-2045.
- Kahlon, T.S., Chow, F.I., Hoefer, J.L. y Betschart, A.A. Bioavailability of vitamins A and E as Influenced by wheat bran and bran particle size. *Cereal Chem.* 63 (1986) 490-493.
- Kaiser, R. y Kraft, P. Surprising aromatic experiences-new and unusual fascinating floral scents from nature. *Chem. Unserer Zeit* 35 (2001) 8-22.
- Kalt, W. Effects of production and processing factors on major fruit and vegetable antioxidants. *J. Food Sci.* 70 (2005) R11-R19.
- Kandlakunta, B., Rajendran, A., y Thingnganing, L. Carotene content of some common (cereals, pulses, vegetables, spices and condiments) and unconventional sources of plant origin. *Food Chem.* 106 (2008) 85-89.
- Kaneko, S. y Oyanagi, A. Varietal differences in the rate of esterification of endosperm lutein during the storage of wheat seeds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59 (1995) 2312-2313.
- Kaneko, S., Nagamine, T. y Yamada, T. Esterification of endosperm lutein with fatty acids during the storage of wheat seeds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59 (1995) 1-4.
- Kapranchikov, V.S., Zhrebtsov, N.A. y Popova, T.N. Purification and characterization of lipase from wheat (*triticum aestivum* L.) germ. *Appl. Biochem. Microbiol.* 40 (2004) 84-88.
- Kean, E.G., Bordenave, N., Ejeta, G., Hamaker, B.R. y Ferruzzi, M.G. Carotenoid bioaccessibility from whole grain and decorticated yellow endosperm sorghum porridge. *J. Cereal Sci.* 54 (2011) 450-459.
- Kean, E.G., Ejeta, G., Hamaker, B.R. y Ferruzzi, M.G. Characterization of carotenoid pigments in mature and developing kernels of selected yellow-endosperm sorghum varieties. *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 2619-2626.
- Kean, E.G., Hamaker, B.R. y Ferruzzi, M.G. Carotenoid bioaccessibility from whole grain and degermed maize meal products. *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 9918-9926.
- Kent, N.L. y Evers, A.D. (1994). Technology of Cereals. Elsevier: Tarrytown, NY.
- Khachik, F. y Beecher, G. R. Separation and identification of carotenoids and carotenol fatty acid esters in some squash products by liquid chromatography. 1. Quantification of carotenoids and related esters by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 36 (1988) 929-937.
- Khachik, F., Beecher, G.R. y Whittaker, N.F. Separation, identification, and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 34 (1986) 603-616.
- Khachik, F., Beecher, G.R., y Lusby, W.R. Separation and identification of carotenoids and carotenol fatty acid esters in some squash products by liquid chromatography. 2. Isolation and characterization of carotenoids and related esters. *J. Agric. Food Chem.*, 36 (1988) 938-946.
- Khachik, F., Goli, M.B. Beecher, G.R., Holden, J., Lusby, W.R., Tenorio, M.D. y Barrera, M.R. Effect of food preparation on qualitative and quantitative distribution of major carotenoid constituents of tomatoes and several green vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 40 (1992) 390-398.
- Khan, S.A., Halling, P.J. y Bell, G. Measurement and control of water activity with an aluminium oxide sensor in organic two-phase reaction mixtures for enzymic catalysis. *Enzyme Microb. Technol.* 12 (1990) 453-458.

- Kihlberg, I., Johansson, L., Kohler, A. y Risvik, E. Sensory qualities of whole wheat pan bread-influence of farming system, milling and baking technique. *J. Cereal Sci.* 39 (2004) 67-84.
- Kim, J. y DellaPenna, D. Defining the primary route for lutein synthesis in plants: The role of *Arabidopsis* carotenoid β -ring hydroxylase CYP97A3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 3474-3479.
- Kim, J., Cheng, K.M., Craft, N.E., Hamberger, B. y Douglas, C.J. Over-expression of *Arabidopsis thaliana* carotenoid hydroxylases individually and in combination with a β -carotene ketolase provides insight into *in vivo* functions. *Phytochem.* 71 (2010a) 168-178.
- Kim, J., Smith, J.J., Tian, L. y DellaPenna, D. The evolution and function of carotenoid hydroxylases in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 50 (2009) 463-479.
- Kim, J.K., Lee, S.Y., Chu, S.M., Lim, S.H., Suh, S., Lee, Y., Cho, H.S. y Ha, S. Variation and correlation analysis of flavonoids and carotenoids in korean pigmented rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010b) 12804-12809.
- King, R.W. Absciscic acid in developing wheat grains and its relationship to grain growth and maturation. *Planta* 132 (1976) 43-51.
- King, R.W. Absciscic acid synthesis and metabolism in wheat ears. *Aust. J. Plant Physiol.* 6 (1979) 99-108.
- Kirby, E.J.M. (2002). Botany of the wheat plant. En "Bread wheat: Improvement and Production". Curtis, B.C., Rajaram, S., Macpherson, H.G. (Eds.). Cap 2, FAO.
- Kirk, J.T.O. y Tilney-Bassett, R.A.E. (1978). Proplastids, etioplasts, amyloplasts, chromoplast and other plastids. En "The plastids: their chemistry, structure, growth and inheritance". Kirk, J.T.O. and Tilney-Bassett, R.A.E. (Eds.), Elsevier/ North Holland Biomedical press, Amsterdam, pp. 217-239.
- Koca, N., Burdurlu, H.S. y Karadeniz, F. Kinetics of color changes in dehydrated carrots. *J. Food Eng.* 78 (2007) 449-455.
- Kolotilin, I., Koltai, H., Tadmor, Y., Bar-Or, C., Reuveni, M., Meir, A. Nahon, S., Shlomo, H., Chen, L. y Levin, I. Transcriptional profiling of high pigment-2dg tomato mutant links early fruit plastid biogenesis with its overproduction of Phytonutrients. *Plant Physiol.* 145 (2007) 389-401.
- Konopka, I., Czaplicki, S. y Rotkiewicz, D. Differences in content and composition of free lipids and carotenoids in flour of spring and winter wheat cultivated in Poland. *Food Chem.* 95 (2006) 290-300.
- Konopka, I., Koziorok, W. y Rotkiewicz, D. Lipids and carotenoids of wheat grain and flour and attempt of correlating them with digital image analysis of kernel surface and cross-sections. *Food Res. Int.* 37 (2004) 429-438.
- Krasteva, A., Petrova, N. y Aljoshev, P. Prognostication of tempering time in wheat conditioning by dielectric heating. *Int. J. Food Sci. Technol.* 43 (2008) 834-837.
- Krawczyk, S. y Britton, G. A study of protein-carotenoid interactions in the astaxanthin-protein crustacyanin by absorption and Stark spectroscopy; evidence for the presence of three spectrally distinct species. *Biochim. Biophys. Acta* 1544 (2001) 301-310.
- Krinsky, N.I. Possible biologic mechanisms for a protective role of xanthophylls. *J. Nutr.* (2002) 540S-542S.
- Krinsky, N.I., Landrum, J.T. y Bone, R.A. Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. *Ann. Rev. Nutr.* 23 (2003) 171-201.
- Kulheim, C., Agren, J. y Jansson, S. Rapid regulation of light harvesting and plant fitness in the field. *Science* 297 (2002) 91-93.
- Kurilich, A.C. y Juvik, J.A. Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in *Zea mays*. *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 1948-1955.
- Lachman, J., Hejtmánková, K. y Kotíková, Z. Tocols and carotenoids of einkorn, emmer and spring wheat varieties: selection for breeding and production. *J. Cereal Sci.* 57 (2013) 207-214.
- LaCroix, L.J. y Lier, J.B. Carotenoids in durum wheat: developmental patterns during two growing seasons. *Can. J. Plant Sci.* 55 (1975) 679-684.

- Lamberts, L. y Delcour, J.A. Carotenoids in raw and parboiled brown and milled rice. *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 11914-11919.
- Landrum, J.T. y Bone, R.A. Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. *Arch. Biochem. Biophys.* 385 (2001) 28-40.
- Lange, B.M. y Ghassemian, M. Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. *Plant Mol. Biol.* 51 (2003) 925-948.
- Large, E.C. Growth stages in cereals illustration of the Feekes scale. *Plant Pathol.* 3 (1954) 128-129.
- Latham, M.C. (2002). Carencia de vitamina A. En: Nutrición humana en el mundo en desarrollo. Colección FAO: Alimentación y nutrición n° 29, cap. 15.
- Laule, O., Fürholz, A., Chang, H., Zhu, T., Wang, X., Heifetz, P.B., Gruissem, W. y Lange, B.M. Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 6866-6871.
- Lavelli, V., Hidalgo, A., Pompei, C. y Brandolini, A. Radical scavenging activity of einkorn (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum*) wholemeal flour and its relationship to soluble phenolic and lipophilic antioxidant content. *J Cereal Sci.* 49 (2009) 319-321.
- Lavelli, V., Zanon, B. y Zaniboni, A. Effect of water activity on carotenoid degradation in dehydrated carrots. *Food Chem.* 104 (2007) 1705-1711.
- Leenhardt, F., Lyan, B., Rock, E., Boussard, A., Potus, J., Chanliaud, E. y Remesy, C. Genetic variability of carotenoid concentration, and lipoxygenase and peroxidase activities among cultivated wheat species and bread wheat varieties. *Eur. J. Agron.* 25 (2006a) 170-176.
- Leenhardt, F., Lyan, B., Rock, E., Boussard, A., Potus, J., Chanliaud, E. y Remesy, C. Wheat lipoxygenase activity induces greater loss of carotenoids than vitamin E during breadmaking. *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006b) 1710-1715.
- Lemmens, L., De Vleeschouwer, K., Moelants, K.R.N., Colle, I.J.P., Loey, A.M.V. y Hendrickx, M.E. β -carotene isomerization kinetics during thermal treatments of carrot puree. *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 6816-6824.
- Lepage, M. y Sims, R.P.A. Carotenoids of wheat flour - their identification and composition. *Cereal Chem.* 45 (1968) 600-604.
- Létang, C., Piau, M. y Verdier, C. Characterization of wheat flour-water doughs. Part I: Rheometry and microstructure. *J. Food Eng.* 41 (1999) 121-132.
- Leubner G (2012). The Seed Biology Place - <http://www.seedbiology.de/>
- Li, F., Murillo, C. y Wurtzel, E.T. Maize Y9 encode a product essential for 15-*cis*-zeta-carotene isomerization. *Plant Physiol.* 144 (2007) 1181-1189.
- Li, F., Tsfadia, O. y Wurtzel, E.T. The phytoene synthase gene family in the grasses. *Plant Signal. Behav.* 4 (2009) 208-211.
- Li, F., Vallabhaneni, R. y Wurtzel, E.T. PSY3, a new member of the phytoene synthase gene family conserved in the poaceae and regulator of abiotic stress-induced root carotenogenesis. *Plant Physiol.* 146 (2008b) 1333-1345.
- Li, F., Vallabhaneni, R., Yu, J., Rocheford, T. y Wurtzel, E.T. The maize phytoene synthase gene family: overlapping roles for carotenogenesis in endosperm, photomorphogenesis, and thermal stress tolerance. *Plant Physiol.* 147 (2008a) 1334-1346.
- Li, L. y Van Eck, J. Metabolic engineering of carotenoid accumulation by creating a metabolic sink. *Transgenic Res.* 16 (2007) 581-585.
- Li, L., Paolillo, D.J., Parthasarathy, M.V., DiMuzio, E.M., y Garvin, D.F. A novel gene mutation that confers abnormal patterns of β -carotene accumulation in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). *Plant J.* 26 (2001) 59-67.
- Li, W. y Beta, T. An evaluation of carotenoid levels and composition of glabrous canaryseed. *Food Chem.* 133 (2012) 782-786.
- Li, Z.H., Matthews, P.D., Burr, B. y Wurtzel, E.T. Cloning and characterization of a maize cDNA encoding phytoene desaturase, an enzyme of the carotenoid biosynthetic pathway. *Plant Mol. Biol.* 30 (1996) 269-279.

- Liaaen-Jensen, S. y Lutnaes, B.F. (2008). E/Z Isomers and Isomerization. En "Carotenoids, vol 4: Natural Functions". Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (eds.). Birkhäuser Verlag Basel, pp. 15-36.
- Liaquat, M. y Apenten, R.K.O. Synthesis of low molecular weight flavor esters using plant seedling lipases in organic media. *J. Food Sci.* 65 (2000) 295-299.
- Lichtenthaler, H.K. The 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 50 (1999) 47-65.
- Lichtenthaler, H.K., Rohmer, M. y Schwender, J. Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiol. Plant* 101 (1997) 643-652.
- Lieberman, M., Segev, O., Gilboa, N., Lalazar, A. y Levin, I. The tomato homolog of the gene encoding UV-damaged DNA binding protein 1 (DDB1) underlined as the gene that causes the high pigment-1 mutant phenotype. *Theor. Appl. Genet.* 108 (2004) 1574-1581.
- Lier, J.B. y Lacroix, L.J. Carotenoids of durum wheat: induced high pigment levels obtained by treatment of the growing plant with chlorophenylthiotriethylamine (CPTA) hydrochloride. *Cereal Chem.* 51 (1974) 188-194.
- Lin, Y.H., Yu, C. y Huang, A.H.C. Substrate specificities of lipases from corn and other seeds. *Arch. Biochem. Biophys.* 244 (1986) 346-356.
- Linden, H., Lucas, M.M., de Felipe, M.R. y Sadmann, G. Immunogold localization of phytoene desaturase in higher plant chloroplasts. *Physiol. Plant.* 88 (1993) 229-236.
- Lindgren, L.O., Stålberg, K.G. y Höglund, A. Seed-specific overexpression of an endogenous *Arabidopsis* phytoene synthase gene results in delayed germination and increased levels of carotenoids, chlorophyll, and abscisic acid. *Plant Physiol.* 132 (2003) 779-785.
- Lindley, M.G. The impact of food processing on antioxidants in vegetable oils, fruits and vegetables. *Trends Food Sci. technol.* 9 (1998) 336-340.
- Lindquist, A. y Anderson, S. Biochemical properties of purified recombinant human β -carotene 15,15'-Monooxygenase. *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 23942-23948.
- Lindsay, M.P. y Skerrett, J.H. The glutenin macropolymer of wheat flour doughs: structure-function perspectives. *Trends Food Sci. Technol.* 10 (1999) 247-253.
- Liu, B., Segal, G., Rong, J.K. y Feldman, M. A chromosome-specific sequence common to the B genome of polyploid wheat and *Aegilops searsii*. *Plant Syst. Evol.* 241 (2003a) 55-66.
- Liu, C.Y., Shepherd, K.W. y Rathjen, A.J. Improvement of durum wheat pastamaking and breadmaking qualities. *Cereal Chem.* 73 (1996) 155-166.
- Liu, R. H. Whole grain phytochemicals and health. *J. Cereal Sci.* 46 (2007) 207-219.
- Liu, Y., Gur, A., Ronen, G., Causse, M., Damidaux, R., Buret, M., Hirschberg, J. y Zamir, D. There is more to tomato fruit colour than candidate carotenoid genes. *Plant Biotechnol. J.* 1 (2003b) 195-207.
- Livingston, A.L., Knowles, R.E., Nelson, J.W. y Kohler, G.O. Xanthophyll and carotene loss during pilot and industrial scale alfalfa processing. *J. Agric. Food Chem.* 16 (1968) 84-87.
- Liyana-Pathirana, C.M. y Shahidi, F. Antioxidant and free radical scavenging activities of whole wheat and milling fractions. *Food Chem.* 101 (2007) 1151-1157.
- Lois, L.M., Rodríguez-Concepción, M., Gallego, F., Campos, N. y Boronat, A. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *Plant J.* 22 (2000) 503-513.
- Lokstein, H., Tian, L., Polle, J.E.W. y DellaPenna, D. Xanthophyll biosynthetic mutants of *Arabidopsis thaliana*: altered nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence is due to changes in photosystem II antenna size and stability. *Biochim. Biophys. Acta* 1553 (2002) 309-319.
- Lomnitski, L., Bar-Natan, R., Sklan, D. y Grossman, S. The interaction between β -carotene and lipoxygenase in plant and animal systems. *Biochim. Biophys. Acta* 1167 (1993) 331-338.
- Lopez, A.B., Van Eck, J., Conlin, B.J., Paolillo, D.J., O'Neill, J. y Li, L. Effect of the cauliflower *Or* transgene on carotenoid accumulation and chromoplast formation in transgenic potato tubers. *J. Exp. Bot.* 59 (2008b) 213-223.

- Lopez, A.B., Yong Yang, Thannhauser, T. W. y Li Li. Phytoene desaturase is present in a large protein complex in the plastid membrane. *Physiol. Plant.* 133 (2008a) 190-198.
- Lotan, T. y Hirschberg, J. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding β -C-4-oxygenase, that converts β -carotene to the ketocarotenoid canthaxanthin in *Haematococcus pluvialis*. *Febs Lett.* 364 (1995) 125-128.
- Lu, S. y Li, L. Carotenoid metabolism: biosynthesis, regulation and beyond. *J. Integr. Plant Biol.* 50 (2008) 778-785.
- Lu, S., Van Eck, J., Zhou, X., Lopez, A.B., O'Halloran, D.M., Cosman, K.M., Conlin, B.J., Paolillo, D.J., Garvin, D.F., Vrebalov, J., Kochian, L.V., Kupper, H., Earle, E.D., Cao, J. y Li, L. The cauliflower or gene encodes a DnaJ cysteine-rich domain-containing protein that mediates high levels of beta-carotene accumulation. *Plant Cell* 18 (2006) 3594-3605.
- Luterotti, S. y Kljak, K. Spectrophotometric estimation of total carotenoids in cereal grain products. *Acta Chim. Slov.* 57 (2010) 781-787.
- Luterotti, S., Marković, K., Franko, M., Bicanic, D., Madžgalj, A. y Kljak, K. Comparison of spectrophotometric and HPLC methods for determination of carotenoids in foods. *Food Chem.* 140 (2013) 390-387.
- Lv, J., Lu, Y., Niu, Y., Whent, M., Ramadan, M.F., Costa, J. y Yu, L. Effect of genotype, environment, and their interaction on phytochemical compositions and antioxidant properties of soft winter wheat flour. *Food chem.* 138 (2013) 454-462.
- Maass, D., Arango, J., Wuest, F., Beyer, P. y Welsch, R. Carotenoid crystal formation in *Arabidopsis* and carrot roots caused by increased phytoene synthase protein levels. *PloS one* 4 (2009) e6373.
- Mace, E.S. y Jordan, D.R. Integrating sorghum whole genome sequence information with a compendium of sorghum QTL studies reveals uneven distribution of QTL and of gene-rich regions with significant implications for a crop improvement. *Theor. Appl. Genet* 123 (2011) 169-191.
- Maiani, G., Periago-Castón, M.J., Catasta, G., Toti, E., Goñi-Cambrodón, I., Bysted, A., Granado-Lorencio, F., Olmedilla-Alonso, B., Knuthsen, P., Valoti, M., Böhm, V., Mayer-Miebach, E., Behnlian, D. y Schlemmer, U. Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* 53 (2009) S194-S218.
- Maluf, M.P., Saab, I.N., Wurtzel, E.T. y Sachs, M.M. The viviparous 12 maize mutant is deficient in abscisic acid, carotenoids, and chlorophyll synthesis. *J. Exp. Bot.* 48 (1997) 1259-1268.
- Mamatha, B., Sangeetha, R. y Baskaran, V. Provitamin-A and xanthophyll carotenoids in vegetables and food grains of nutritional and medicinal importance. *Int. J. Food Technol.* 46 (2011) 315-323.
- Maoka, T., Fujiwara, Y., Hashimoto, K. y Akimoto, N. Rapid identification of carotenoids in a combination of liquid chromatography/UV-visible absorption spectrometry by photodiode-array detector and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (LC/PAD/APCI-MS). *J. Oleo Sci.* 51 (2002) 1-9.
- Mares-perlman, J.A., Millen, A.E., Ficek, T.L. y Hankinson, S.E. The body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin in delaying chronic disease. Overview. *J. Nutr.* 132 (2002) 518S-524S.
- Marquart, L., Slavin, J.L. y Fulcher, R.G. (2002). Whole Grain Foods in Health and Disease. Marquart, L., Slavin, J.L. y Fulcher, R.G. (Eds.), Am. Assoc. Cereal Chem., St. Paul, MN.
- Marsh, D.R. y Galliard, T. Measurement of polyphenol oxidase activity in wheat-milling fractions. *J. Cereal Sci.* 4 (1986) 241-248.
- Martín, A. y Chapman, V. A hybrid between *Hordeum chilense* and *Triticum aestivum*. *Cereal Reserch. Commun.* 5 (1977) 365-368.
- Martín, A. y Sanchez-Monge Laguna, E. A hibrid between *Hordeum chilense* and *Triticum turgidum*. *Cereal Res. Comm.* 81 (1980) 349-353.
- Martín, A. y Sanchez-Monge Laguna, E. Cytology and morphology of the amphiploid *Hordeum Chilense* x *Triticum turgidum* conv. *durum*. *Euphytica* 31 (1982) 261-267.
- Martín, A., Álvarez, J.A., Martín, L.M., Barro, F. y Ballesteros, J. The development of tritordeum: a novel cereal for food processing. *J. Cereal Sci.* 30 (1999) 85-95.

- Marx, M., Stuparic, M., Schieber, A. y Carle, R. Effects of thermal processing on trans-cis-isomerization of β -carotene in carrot juices and carotene-containing preparations. *Food Chem.* 83 (2003) 609-617.
- Marzábal, P., Busk, P.K., Ludevid, M.D. y Torrent, M. The bifactorial endosperm box of γ -zein gene: characterisation and function of the Pb3 and GZM cis-acting elements. *Plant J.* 16 (1998) 41-52.
- Matile, P. y Martinoia, E. Catabolism of carotenoids: Involvement of peroxidase? *Plant cell Rep.* 1 (1982) 244-246.
- Matlashewski, G.J., Urquhart, A.A., Sahasrabudhe, M.R. y Altosaar, I. Lipase activity in oat flour suspensions and soluble extracts. *Cereal Chem.* 59 (1982) 418-422.
- Matsui, K., Yoshida, M., Ban, T., Komatsuda, T. y Kawada, N. Role of male-sterile cytoplasm in resistance to barley yellow mosaic virus and Fusarium head blight in barley. *Plant Breed.* 121 (2002) 237-240.
- Matsumoto, H., Ikoma, Y., Kato, M., Nakajima, N. y Hasegawa, Y. Effect of postharvest temperature and ethylene on carotenoid accumulation in the flavedo and juice sacs of Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) fruit. *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 4724-4732.
- Matthews, P.D. Luo, R. y Wurtzel, E.T. Maize phytoene desaturase and ζ -carotene desaturase catalyse a poly-Z desaturation pathway: implications for genetic engineering of carotenoid content among cereal crops. *J. Exp. Bot.* 54 (2003) 2215-2230.
- Matusova, R., Rani, K., Verstappen, F.W., Franssen, M.C. Beale, M.H. y Bouwmeester, H.J. The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobanch* spp. Are derived from the carotenoid Pathway. *Plant Physiol.* 139 (2005) 920-934.
- Mayne, S.T. y Parker, R.S. Antioxidant activity of dietary canthaxanthin. *Nutr. Cancer* 12 (1989) 225-236.
- McCallum, J.A. y Walker, J.R.L. O-Diphenol oxidase activity, phenolic content and colour of new zealand wheats, flours and milling streams. *J. Cereal Sci.* 12 (1990) 83-96.
- McFadden, E.S. y Sears, E.R. The origin of *Triticum spelta* and its free-threshing hexaploid relatives. *J. Hered.* 37 (1946) 81-89, 107-116.
- McGraw, K., Nolan, P. y Crino, O. Carotenoid accumulation strategies for becoming a colourful house finch: analyses of plasma and liver pigments in wild moulting birds. *Funct. Ecol.* 20 (2006) 678-688.
- McKevith, B. Nutricional aspects of cereals. *Nutrition Bulletin* 29 (2004) 111-142.
- Mellado-Ortega, E. y Hornero-Méndez, D. Isolation and identification of lutein esters, including their regioisomers, in tritordeum (x *Tritordeum* Ascherson et Graebner) grains: evidence for a preferential xanthophyll acyltransferase activity. *Food Chem.* 135 (2012) 1344-1352.
- Menkir, A. y Maziya-Dixon, B. Influence of genotype and environment on β -carotene content of tropical yellow-endosperm maize genotypes. *Maydica* 49 (2004) 313-318.
- Mergoum, M., Singh, P.K., Anderson, J.A., Peña, R.J., Singh, R.P., Xu, S.S. y Ransom, J.K. (2009). Spring Wheat Breeding. En "Cereals". Carena, M.J. (ed.), Springer Science + Bussiness Media, LLC, Alemania, Cap.3, pag. 127-156.
- Mertz, C., Brat, P., Caris-Veyrat, C. y Gunata, Z. Characterization and thermal lability of carotenoids and vitamin C of tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). *Food Chem.* 119 (2010) 653-659.
- Merzlyak, M.N. y Solovchenko, A.E. Photostability of pigments in ripening apple fruit: a possible photoprotective role of carotenoids during plant senescence. *Plant Sci.* 163 (2002) 881-888.
- Mialoundama, A.S., Heintz, D., Jadid, N., Nkeng, P., Rahier, A., Deli, J., Camara, B. y Bouvier, F. Characterization of plant carotenoid cyclases as members of the flavoprotein family functioning with no net redox change. *Plant Physiol.* 153 (2010) 970-979.
- Miller, B.S. y Kummerow, F.A. The disposition of lipase and lipoxidase in baking and the effect of their reaction products on consumer acceptability. *Cereal Chem.* 25 (1948) 391-398.
- Miller, C., Austin, H., Posorske, L. y González, J. Characteristics of an immobilized lipase for the commercial synthesis of esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65 (1988) 927-931.
- Mínguez Mosquera, M.I. y Garrido Fernández, J. Chlorophyll and carotenoid presence in olive fruti (*Olea europaea*, L.). *J. Agric. Food Chem.* 40 (1989) 60-63.

- Mínguez Mosquera, M.I.; Jarén Galán, M.; Gandul Rojas, B; Hornero Méndez, D.; Garrido Fernández, J. y Gallardo Guerrero, L. (1997). "Clorofilas y carotenoides en tecnología de alimentos". Servicio de Publicaciones de la Universidad de Sevilla. (Ed).
- Mínguez-Mosquera, M. I. y Pérez-Gálvez, A. Study of lability and kinetics of the main carotenoid pigments of red pepper in the de-esterification reaction. *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 566-569.
- Mínguez-Mosquera, M. y Hornero-Méndez, D. Formation and transformation of pigments during the fruit ripening of *Capsicum annuum* cv. Bola and Agridulce. *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994a) 38-44.
- Mínguez-Mosquera, M.I. y Gallardo-Guerrero, L. Role of chlorophyllase in chlorophyll metabolism in olives cv Gordal. *Phytochem.* 41 (1996) 691-697.
- Mínguez-Mosquera, M.I. y Gandul-Rojas, B. Mechanism and kinetics of carotenoid degradation during the processing of green table olives. *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 1551-1554.
- Mínguez-Mosquera, M.I. y Hornero-Méndez, D. Changes in carotenoid esterification during ripening of *Capsicum annuum* cv. Bola. *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994b) 640-644.
- Mínguez-Mosquera, M.I. y Hornero-Méndez, D. Separation and quantification of the carotenoid pigments in red peppers (*Capsicum annuum* L.), paprika and oleoresin by reversed-phase HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 41 (1993) 1616-1620.
- Mínguez-Mosquera, M.I., Hornero-Méndez, D. y Pérez-Gálvez, A. (2002) Carotenoid and provitamin A in Functional Foods. En "Methods of Análisis for Functional Foods and Nutraceuticals." Hurst, W.J. (Ed.), CRC Press, Boca Ratón, (EEUU), Cap. 3, pag. 101-157.
- Moehs, C.P., Tian, L., Osteryoung, K.W. y DellaPenna, D. Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development. *Plant Mol. Biol.* 45 (2001) 281-293.
- Monreal, M., De Ancos, B. y Cano, M.P. Influence of critical storage temperatures on degradative. Pathways of pigments in green beans (*Phaseolus vulgaris* cvs. Perona and Bobby). *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 19-24.
- Moore, J., Hao, Z., Zhou, K., Luther, M., Costa, J. y Yu, L. Carotenoid, tocopherol, phenolic acid, and antioxidant properties of Maryland-grown soft wheat. *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 6649-6657.
- Moran, N.A. y Jarvik, T. Lateral transfer of genes from fungi underlies carotenoid production in aphids. *Science* 328 (2010) 624-627.
- Moros, E.E., Darnoko, D., Cheryan, M., Perkins, E.G. y Jerrell, J. Analysis of xanthophylls in corn by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 5787-5790.
- Morris, W.L., Ducreux, L., Griffiths, D.W., Stewart, D., Davies, H.V. y Taylor, M.A. Carotenogenesis during tuber development and storage in potato. *J. Exp. Bot.* 55 (2004) 975-982.
- Morrison, R.W. Wheat lipid composition. *Cereal Chem.* 55 (1978) 548-558.
- Morrison, W.R. y Panpaprai, R. Oxidation of free and esterified linoleic and linolenic acids in bread doughs by wheat and soya lipoxygenase. *J. Sci. Food Agric.* 26 (1975) 1225-1236.
- Mortensen, A. y Skibsted, L.H. Importance of carotenoid structure in radical-scavenging reactions. *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 2970-2977.
- Nagata, N., Suzuki, M., Yoshida, S. y Muranaka, T. Mevalonic acid partially restores chloroplast and etioplast development in *Arabidopsis* lacking the non-mevalonate pathway. *Planta* 216 (2002) 345-350.
- Nakao, M., Sumida, M., Katano, K. y Fukami, H. Enzymatic synthesis of astaxanthin n-octanoic acid esters. *J. Oleo Sci.* 57 (2008) 371-374.
- Nakornriab, M., Sriseadka, T. y Wongpornchai, S. Quantification of carotenoid and flavonoid components in brans of some Thai black rice cultivars using supercritical fluid extraction and high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Food Lipids* 15 (2008) 488-503.
- Nambara, E. y Marion-Poll, A. ABA action and interactions in seeds. *Trends Plant Sci.* 8 (2003) 213-217.
- Nambara, E. y Marion-Poll, A. Absciscic acid biosynthesis and catabolism. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56 (2005) 165-185.
- Nanditha, B. y Prabhasankar, P. Antioxidants in bakery products: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 49 (2009) 1-27.

- Naqvi, S., Zhu, C., Farre, G., Ramessar, K., Bassie, L., Breitenbach, J., Conesa, D.P., Ros, G., Sandmann, G., Capell, T. y Christou, P. Transgenic multivitamin corn through biofortification of endosperm with three vitamins representing three distinct metabolic pathways. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 106 (2009) 7762-7767.
- Ncube, I., Gitlesen, T., Adlercreutz, P., Read, J.S. y Mattiasson, B. Fatty acid selectivity of a lipase purified from *Vernonia galamensis* seed. *Biochim. Biophys. Acta* 1257 (1995) 149-156.
- Ndolo, V.U. y Beta, T. Distribution of carotenoids in endosperm, germ, and aleurone fractions of cereal grain kernels. *Food Chem.* 139 (2013) 663-671.
- Nesterenko, S. y Sink, K.C. Carotenoid profiles of potato breeding lines and selected cultivars. *Hortscience* 38 (2003) 1173-1177.
- Nevo, E. y Payne, P.I. Wheat storage proteins: diversity of HMW glutenin subunits in wild emmer from Israel. *Theor. Appl. Genet.* 74 (1987) 827-836.
- Nghia, P.T., Liem, D.T., Hai, T.V. y Hoa, T.T.C. Effect of storage conditions on total carotenoid content in golden rice grains. *Omonrice* 14 (2006) 18-27.
- Nhung, D.T.T., Bung, P.N., Ha, N.T. y Phong, T.K. Changes in lycopene and beta carotene contents in aril and oil of gac fruit during storage. *Food Chem.* 121 (2010) 326-331.
- Nicoli, M.C., Anese, M. y Parpinel, M. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends Food Sci. Technol.* 10 (1999) 94-100.
- Nielsen, O.F. y Gough, S. Macromolecular physiology of plastids XI. Carotenes in etiolated *tigrina* and *xantha* mutants of barley. *Physiol. Plant.* 30 (1974) 246-251.
- Nievelstein, V., Vandekerckhove, J., Tadros, M.H., Nitschke, W. y Beyer, P. Carotene desaturation is linked to a respiratory redox pathway in Narcissus-Pseudonarcissus chromoplast membranes-involvement of a 23-kDa oxygen-evolving-complex-like protein. *Eur. J. Biochem.* 233 (1995) 864-872.
- Niyogi, K.K. Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50 (1999) 333-359.
- Niyogi, K.K., Grossman, A.R. y Bjorkman, O. Arabidopsis mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *Plant Cell* 10 (1998) 1121-1134.
- Norris, S.R., Barrette, T. R. y DellaPenna, D. Genetic dissection of carotenoid synthesis in *Arabidopsis* defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. *Plant Cell* 7 (1995) 2139-2149.
- North, H.M., De Almeida, A., Boutin, J., Frey, A., To, A., Botran, L., Sotta, B. y Marion-Poll, A. The Arabidopsis ABA-deficient mutant *aba4* demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. *Plant J.* 50 (2007) 810-824.
- O'Connor, J., Perry, H.J. y Harwood, J.L. A comparison of lipase activity in various cereal grains. *J. Cereal Sci.* 16 (1992) 153-163.
- O'Kennedy, M.M., Grootboom, A. y Shewry, P.R. Harnessing sorghum and millet biotechnology for food and health. *J. Cereal Sci.* 44 (2006) 224-235.
- O'Neil, C.A. y Schwartz, S.J. Chromatographic analysis of *cis/trans* carotenoid isomers. *J. Chromatogr. A* 624 (1992) 235-252.
- Ogura, K., Koyama, T. y Sagami, H. Polyprenyl diphosphate synthases. *Sub-cell. Biochem.* 28 (1997) 57-87.
- Ohmiya, A., Kishimoto, S., Aida, R., Yoshioka, S. y Sumitomo, K. Carotenoid cleavage dioxygenase (CmCCD4a) contributes to white color formation in chrysanthemum petals. *Plant Physiol.* 142 (2006) 1193-1201.
- Okada, K., Saito, T., Nakagawa, T., Kawamukai, M. y Kamiya, Y. Five geranylgeranyl diphosphate synthases expressed in different organs are localized into three subcellular compartments in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 122 (2000) 1045-1056.
- Okarter, N., Liu, C., Sorrells, M. y Liu, R. Phytochemical content and antioxidant activity of six diverse varieties of whole wheat. *Food Chem.* 119 (2010) 249-257.

- Oliver, J. y Palou, A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. *J. Chromatogr A* 881 (2000) 543-555.
- Oliver, J.R., Blakeney, A.B. y Allen, H.M. The colour of flour streams as related to ash and pigment contents. *J. Cereal Sci.* 17 (1993) 169-182.
- Olmedilla, B., Granado, F., Southon, S., Wright, A.J.A., Blanco, I., Gil-Martínez, E., Van den Berg, H., Roussel, A.M., Corridan, B., Thurnham, D.I. y Chopra, M., Baseline serum concentrations of carotenoids, vitamins A, E and C in control subjects from five European countries. *Br. J. Nutr.* 85 (2001) 227-238.
- Olson, J.A. y Hayaishi, O. The enzymatic cleavage of β -carotene into vitamin A by soluble enzymes of rat liver and intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 54 (1965) 1364-1370.
- Omenn, G.S., Goodman, G.E., Thornquist, M.D., Balmes, J., Gullen, M.R., Glass, D., Keogh, J.P., Meyskens, F.L., Valanis, B., Williams, J.M., Barnhart, S. y Hammar, S. Effects a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* 334 (1996) 1150-1155.
- Osborne, T.B. (1907). The proteins of the wheat-kernel. Publication 84. Carnegie Institution, Washington, DC.
- Ouchi, A., Aizawa, K., Iwasaki, Y., Inakuma, T., Terao, J., Nagaoka, S. y Mukai, K. kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by carotenoids and food extracts in solution. Development of a singlet oxygen absorption capacity (SOAC) assay method. *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 9967-9978.
- Paetzold, H., Garms, S., Bartram, S., Wieczorek, J., Uros-Gracia, E.V., Rodríguez-Concepción, M., Boland, W., Strack, D., Hause, B. y Walter, M.H. The isogene 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase 2 controls isoprenoid profiles, precursor pathway allocation, and density of tomato trichomes. *Mol. Plant* 3 (2010) 904-916.
- Paine, J.A., Shipton, C.A., Chaggner, S., Howells, R.M., Kennedy, M.J. Vernon, G., Wright, S.Y., Hinchliffe, E., Adams, J.L. Silverstone, A. y Drake, R. Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nat. Biotechnol.* 23 (2005) 482-487.
- Pajkovic, N. y van Bremmen, R. (2005). Analysis of carotenoids using atmospheric pressure chemical ionization mass psectrometry. En "Modern Methods for Lipid Analysis by Liquid Chromatography." Byrdwell, C. (Ed.) AOCS Publishing, Champaign, Illinois (EEUU), Cap. 8, pag. 413-430.
- Palaisa, K.A., Morgante, M., Williams, M. y Rafalski, A. Contrasting effects of selection on sequence diversity and linkage disequilibrium at two phytoene synthase loci. *Plant Cell* 15 (2003) 1795-1806.
- Pallarés M., León, A.E. y Rosell, C.M. (2007) Trigo. En "De tales panes tales harinas". León, A.E. y Rosell, C. M. (Eds), Hugo Báez (Editorial), Córdoba (Argentina), Cap. 1, pag. 17-72.
- Palozza, P. y Krinsky, N.I. Antioxidant effects of carotenoids in vivo and in vitro: an overview. *Method Enzymol.* 213 (1992) 403-420.
- Panfili, G., Cinquanta, L., Fratianni, A. y Cubadda, R. Extraction of wheat germ oil by supercritical CO₂: oil and defatted cake characterization. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 80 (2003)157-161.
- Panfili, G., Fratianni, A. y Distaam, M. Improved normal-phase high-performance liquid chromatography procedure for the determination of carotenoids in cereals. *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 6373-6377.
- Panfili, G., Fratianni, A. y Irano, M. Change in tocochromanol and carotenoid content during technological processes of cereals. *Tec. Molitoria* 5 (2005) 493-498.
- Pareyt, B., Finnie, S.M. Putseys, J.A. y Delcour, J.A. Lipids in bead making: sources, interactions, and impact on bread quality. *J. cereal Sci.* 54 (2011) 266-279.
- Park, H., Kreunen, S.S., Cuttriss, A.J., DellaPenna, D. y Pogson, B.J. Identification of the carotenoid isomerase provides insight into carotenoid biosynthesis, prolamellar body formation, and photomorphogenesis. *Plant Cell* 14 (2002) 321-332.
- Parker, R.S. Absorption, metabolism and transport of carotenoids. *FASEB J.* 10 (1996) 542-551.
- Parker, R.S., Swanson, J. E., You, C. Edwards, A. J. y T. Huang. Bioavailability of carotenoids in human subjects. *Proc. Nutr. Soc.* 58 (1999) 155-162.

- Parry, A.D. y Horgan, R. Absciscic acid biosynthesis in roots. 1. The identification of potential absciscic acid precursors, and other carotenoids. *Planta* 187 (1992) 185-191.
- Pastore, D., Trono, D., Padalino, L., Simone, S., Valenti, D., Di Fonzo, N. y Passarella, S. Inhibition by α -tocopherol and L-ascorbate of linoleate hydroperoxidation and β -carotene bleaching activities in durum wheat semolina. *J. Cereal Sci.* 31 (2000) 41-54.
- Paterson, A.H., Bowers, J.E., Bruggmann, R., Dubchak, I., Grimwood, J., Gundlach, H., Haberer, G., Hellsten, U., Mitros, T., Poliakov, A., Schmutz, J., Spannagl, M., Tang, H., Wang, X., Wicker, T., Bharti, A.K., Chapman, J., Feltus, F.A., Gowik, U., Grigoriev, I.V., Lyons, E., Maher, C.A., Martis, M., Narechania, A., Otiillar, R.P., Penning, B.W., Salamov, A.A., Wang, Y., Zhang, L., Carpita, N.C., Freeling, M., Gingle, A.R., Hash, C.T., Keller, B., Klein, P., Kresovich, S., McCann, M.C., Ming, R., Peterson, D.G., Mehboob-ur-Rahman, Ware, D., Westhoff, P., Mayer, K.F.X., Messing, J. y Rokhsar, D.S. The sorghum bicolor genome and the diversification of grasses. *Nature* 457 (2009) 551-556.
- Patil, R.M., Oak, M.D., Tamhankar, S.A., Sourdille, P. y Rao, V.S. Mapping and validation of a major QTL for yellow pigment content on 7AL in durum wheat (*Triticum turgidum* L. ssp. *durum*). *Mol. Breeding* 21 (2008) 485-496.
- Paulsen, H. (1999). Carotenoids and the assembly of light-harvesting complexes. En "the photochemistry of carotenoids". Frank, H., Young, A., Britton, G. y Cogdell, R. (Eds.), Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, Vol 8, pp. 123-135.
- Pecker, I. Gavia, R., Cunningham, F.X. Jr, y Hirschberg, J. Cloning and chracterization of the cDNA for lycopene beta-cyclase from tomato reveals decrease in its expression during fruit ripening. *Plant Mol. Biol.* 30 (1996) 807-819.
- Pérez-Gálvez, A. y Mínguez-Mosquera, M. I. Degradation of non-esterified and esterified xanthophylls by free radicals. *Biochim. Biophys. Acta* 1569 (2002b) 31-34.
- Pérez-Gálvez, A. y Mínguez-Mosquera, M. I. Esterification of xanthophylls and its effect on chemical behavior and bioavailability of carotenoids in the human. *Nutr. Res.* 25 (2005) 631-640.
- Pérez-Gálvez, A. y Mínguez-Mosquera, M.I. (2002a). Lipid environment as modulator of the oxidation process of xanthophylls present in red pepper fruit (*Capsicum annuum* L.) En "Proceedings of the 2nd international congress on pigments in food-functionalities of pigments in food". J.A. Empis (ed). Lisboa, 11-14 junio.
- Pérez-Gálvez, A., Jarén-Galán, M. y Mínguez-Mosquera, M. I. Effect of high-temperature degradative processes on ketocarotenoids present in paprika oleoresins. *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 2966-2971.
- Petersen, G., Seberg, O., Yde, M. y Berthelsen, K. Phylogenetic relationships of triticum and Aegilops and evidence for the origin of the A, B, and D genomes of common wheat (*Triticum aestivum*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 39 (2006) 70-82.
- Pfeiffer, W.H. y McClafferty, B. HarvestPlus: breeding crops for better nutrition. *Crop Sci.* 47 (2007) S88-S105.
- Philip, T. y Francis, F. J. Oxidation of capsanthin. *J. Food Sci.* 36 (1971) 96-97.
- Phillips, M.A., D'Auria, J.C., Gershenzon, J. y Pichersky, E. The Arabidopsis Thaliana type I isopentenyl diphosphate isomerases are targeted to multiple subcellular compartments and have overlapping functions in isoprenoid biosynthesis. *Plant Cell* 20 (2008b) 677-696.
- Phillips, M.A., León, P., Boronat, A., y Rodríguez-Concepción, M. The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources. *Trends Plant Sci.* 13 (2008a) 619-623.
- Pinzino, C., Nanni, B. y Zandomenighi, M. Aging, free radicals, and antioxidants in wheat seeds. *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 1333-1339.
- Pistón, F., Dorado, G., Martín, A. y Barro, F. Cloning of nine γ -gliadin mRNAs (cDNAs) from wheat and the molecular characterization of comparative transcript levels of γ -gliadin subclasses. *J. Cereal Sci.* 43 (2006) 120-128.
- Pizarro, L. y Stange, C. Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Cien. Inv. Agr.* 36 (2009) 143-162.
- Pizza-Anunciato, T. y Alves da Rocha-Filho, P. Carotenoids and polyphenols in nutricosmetics, nutraceuticals, and cosmeceuticals. *J. Cosmet. Dermatol.* 11 (2012) 51-54.

- Pogson, B.J., McDonald, K.A., Truong, M., Britton, G. y DellaPenna, D. Arabidopsis carotenoid mutants demonstrate that lutein is not essential for photosynthesis in higher plants. *Plant Cell* 8 (1996) 1627-1639.
- Pogson, B.J., Niyogi, K.K., Björkman, O. y Dellapenna, D. Altered xanthophyll compositions adversely affect chlorophyll accumulation and nonphotochemical quenching in Arabidopsis mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95 (1998) 13324-13329.
- Pogson, B.J., Rissler, H.M. y Frank, H.A. (2005). The roles of carotenoids in photosystem II of higher plants. En "Photosystem II: the light-driven water: plastoquinone oxidoreductase". Wydrzynski, T., Satoh, K. (Eds.), Springer-Verlag: Dordrecht, The Netherlands, pp. 515-537.
- Poletti, S., Gruissem, W. y Sautter, C. The nutritional fortification of cereals. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15 (2004) 162-165.
- Polidori, M.C., Spirt, S.D., Wilhelm Stahl, W. y Ludger Pientka, L. Conflict of evidence: Carotenoids and other micronutrients in the prevention and treatment of cognitive impairment. *Biofactors* 38 (2012) 167-171.
- Polívka, T. y Frank, H.A. Molecular factors controlling photosynthetic light harvesting by carotenoids. *Account Chem. Res.* 43 (2010) 1125-1134.
- Porta, H. y Rocha-Sosa, M. Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant Physiol.* 130 (2002) 15-21.
- Posner, E.S. y Hibbs, A.N. (2005). Wheat flour milling. Am. Assoc.Cereal Chem., St. Paul, MN.
- Potrykus, I. Golden Rice and beyond. *Plant Physiol.* 125 (2001) 1157-1161.
- Pott, I., Marx, M., Neidhart, S., Mühlbauer, W. y Carle, R. Quantitative determination of β -Carotene stereoisomers in fresh, dried and solar-dried mangoes (*Mangifera indica* L.). *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 4527-4531.
- Pozniak, C.J., Knox, R.E., Clarke, F.R. y Clarke, J.M. Identification of QTL and association of a phytoene synthase gene with endosperm colour in durum wheat. *Theor. Appl. Genet.* 114 (2007) 525-537.
- Prabhasankar, P. y Rao, P.H. Effect of different milling methods on chemical composition of whole wheat flour. *Eur. Food Res. Technol.* 213 (2001) 465-469.
- Prabhasankar, P. y Rao, P.H. Lipids in wheat flour streams. *J. Cereal Sci.* 30 (1999) 315-322.
- Provan, J., Wolters, P., Caldwell, K.H. y Powell, W. High-resolution organellar genome analysis of *Triticum* and *Aegilops* sheds new light on cytoplasm evolution in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 108 (2004) 1182-1190.
- Qin, X., Zhang, W., Dubcovsky, J. y Tian, L. Cloning and comparative analysis of carotenoid β -hydroxylase genes provides new insights into carotenoid metabolism in tetraploid (*Triticum turgidum* ssp. *durum*) and hexaploid (*Triticum aestivum*) wheat grains. *Plant Mol. Biol.* 80 (2012) 631-646.
- Quackenbush, F.W. Corn carotenoids: effects of temperature and moisture on losses during storage. *Cereal Chem.* 40 (1963) 266-269.
- Quackenbush, F., Firch, J., Rabourn, W., Mcquistan, M., Petzold, E. y Kargl, T.E. Composition of corn. Analysis of carotenoids in corn grain. *J. Agric. Food Chem.* 9 (1961) 132-135.
- Quinlan, R.F., Shumskaya, M., Bradbury, L.M.T., Beltrán, J., Ma, C., Kennelly, E.J. y Wurtzel, E.T. Synergistic interactions between carotene ring hydroxylases drive lutein formation in plant carotenoid biosynthesis. *Plant Physiol.* 160 (2012) 204-214.
- Rahmatullah, M.S.K., Shukla, V.K.S. y Mukherjee, K.D. γ -Linolenic acid concentrates from borage and evening primrose oil fatty acids *via* lipase-catalyzed esterification. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71 (1994) 563-567.
- Ralley, L., Enfissi, E.M.A., Misawa, N., Schuch, W., Bramley, P.M. y Fraser, P.D. Metabolic engineering of ketocarotenoid formation in higher plants. *Plant J.* 39 (2004) 477-486.
- Ram, M.S., Dowell, F.E., Seitz, L. y Lookhart, G. Development of standard procedures for a simple rapid test to determine wheat color class. *Cereal Chem.* 79 (2002) 230-237.
- Ramachandran, A., Pozniak, C.J., Clarke, J.M. y Singh, A.K. Carotenoid accumulation during grain development in durum wheat. *J. Cereal Sci.* 52 (2010) 30-38.

- Ramados, C.S., Pistorius, E.K., Axelrod, B. Coupled oxidation of carotene by lipoxygenase requires two isozymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 190 (1978) 549-552.
- Rani, K.U., Prasada Rao, U.J.S., Leelavathi, K. y Haridas Rao, P. Distribution of enzymes in wheat flour mill streams. *J. Cereal Sci.* 34 (2001) 233-242.
- Rao, A.V., Ray, R.M. y Rao, L.G. Lycopene. *Adv. Food Nutr. Res.* 51 (2006) 99-164.
- Ravanello, M.P., Ke, D., Alvarez, J., Huang, B. y Shewmaker, C.K. Coordinate expression of multiple bacterial carotenoid genes in canola leading to altered carotenoid production. *Metab. Eng.* 5 (2003) 255-263.
- Ravel, C., Dardevet, M., Leenhardt, F., Bordes, J., Joseph, J.L., Perretant, M.R., Exbrayat, F., Poncet, C., Balfourier, F., Chanliaud, E. y Charmet, G. Improving the yellow pigment content of bread wheat flour by selecting the three homoeologous copies of *Psy1*. *Mol. Breeding* 31 (2013) 87-99.
- Rezanka, T., Olsozka, J., Sobotka, M. y Sigler, K. The use of APCI-MS with HPLC and other separation techniques for identification of carotenoids and related compounds. *Curr. Anal. Chem.* 5 (2009) 1-25.
- Ribaut, J.M. y Hoisington, D. Marker-assisted selection: new tools and strategies. *Trends Plant Sci.* 3 (1998) 236-239.
- Ribeiro, H.S. y Schubert, H. Stability of Lycopene emulsions in food systems. *J. Food Sci.* 68 (2003) 2730-2734.
- Rice-Evans, C.A., Sampson, J., Bramley, P.M. y Holloway, D.E. Why do we expect carotenoids to be antioxidants *in vivo*? *Free Radical Res.* 26 (1997) 381-398.
- Rizzolo, A. y Polesello, S. Chromatographic determination of vitamins in foods. *J. Chromatogr. A* 624 (1992) 103-152.
- Robinson, D.S., Wu, Z., Domoney, C. y Casey, R. Lipoxygenases and the quality of foods. *Food Chem.* 54 (1995) 33-43.
- Rock, C.D. y Zeewart, J.A.D. The aba mutant of *Arabidopsis thaliana* is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991) 7496-7499.
- Rodríguez-Amaya, D.B. (1997). Carotenoids and food preparation: the retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed, and stored foods.
- Rodríguez-Amaya, D.B. (2001). A guide to carotenoid analysis in foods. ILSI PRESS International Life Sciences Institute One Thomas Circle, N.W. Washington, D. C.
- Rodríguez-Amaya, D.B. Food carotenoids: analysis, composition and alterations during storage and processing of foods. *Forum Nutr.* 56 (2003) 35-7.
- Rodríguez-Concepción, M. Supply of precursors for carotenoid biosynthesis in plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 504 (2010) 118-122.
- Rodríguez-Concepción, M. y Boronat, A. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol.* 130 (2002) 1079-1089.
- Rodríguez-Concepción, M., Ahumada, I., Diez-Juez, E., Sauret-Gueto, S., Lois, L.M., Gallego, F., Carretero-Paulet, L., Campos, N. y Boronat, A. 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and plastid isoprenoid biosynthesis during tomato fruit ripening. *Plant J.* 27 (2001) 213-222.
- Rodríguez-Concepción, M., Forés, O., Martínez-García, J.F., González, V., Phillips, M.A., Ferrer, A. y Boronat, A. Distinct light-mediated pathways regulate the biosynthesis and exchange of isoprenoid precursors during *Arabidopsis* seedling development. *Plant Cell* 16 (2004) 144-156.
- Rodríguez-Suárez, C. y Atienza, S.G. *Hordeum chilense* genome, a useful tool to investigate the endosperm yellow pigment content in the *Triticeae*. *BMC Plant Biol.* 12 (2012) 200.
- Rodríguez-Suárez, C., Atienza, S.G. y Pistón, F. Allelic variation, alternative splicing and expression analysis of *Psy1* gene in *Hordeum chilense* Roem. et Schult. *Plos one* 6 (2011a) e19885.
- Rodríguez-Suárez, C., Giménez, M.J. y Atienza, S.G. Progress and perspectives for carotenoid accumulation in selected *triticeae* species. *Crop Pasture Sci.* 61 (2010) 743-751.

- Rodríguez-Suárez, C., Giménez, M.J., Gutiérrez, N., Ávila, C.M., Machado, A., Huttner, E., Ramírez, M.C., Martín, A.C., Castillo, A., Kilian, A., Martín, A. y Atienza, S.G. Development of wild barley (*Hordeum chilense*)-derived DArT markers and their use into genetic and physical mapping. *Theor. Appl. Genet.* 124 (2012) 713-722.
- Rodríguez-Suárez, C., Giménez, M.J., Ramírez, M.C., Martín, A.C., Gutierrez, N., Ávila, C.M., Martín, A. y Atienza, S.G. Exploitation of nuclear and cytoplasm variability in *Hordeum chilense* for wheat breeding. *Plant Genetic Resources* 9 (2011b) 313-316.
- Rodríguez-Villalón, A., Gas, E. y Rodríguez-Concepción, M. Colors in the dark: a model for the regulation of carotenoid biosynthesis in etioplasts. *Plant Signal. Behav.* 4 (2009b) 965-967.
- Rodríguez-Villalón, A., Gas, E. y Rodríguez-Concepción, M. Phytoene synthase activity controls the biosynthesis of carotenoids and the supply of their metabolic precursors in dark-grown *Arabidopsis* seedlings. *Plant J.* 60 (2009a) 424-435.
- Rojas, J.A., Rosell, C.M., Barber, B., Pérez-Munuera, I. y Lluch, M.A. The baking process of wheat rolls followed by cryo scanning electron microscopy. *Eur. Food Res. Technol.* 212 (2000) 57-63.
- Román-Gutiérrez, A.D., Guilbert, S. y Cuq, B. Description of microstructural changes in wheat flour and flour components during hydration by using environmental scanning electron microscopy. *Lebensm.-Wiss.-Technol.* 35 (2002) 730-740.
- Römer, S., Hugueney, P., Bouvier, F., Camara, B. y Kuntz, M. Expression of the Genes Encoding the Early Carotenoid Biosynthetic-enzymes in *Capsicum annuum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196 (1993) 1414-1421.
- Römer, S., Lübeck, J., Kauder, F., Steiger, S., Adomat, C. y Sandmann, G. Genetic engineering of a zeaxanthin-rich potato by antisense inactivation and co-suppression of carotenoid epoxidation. *Metab. Eng.* 4 (2002) 263-272.
- Ronen, G., Carmel-Goren, L., Zamir, D. y Hirschberg, J. An alternative pathway to β -carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of beta and old-gold color mutations in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97 (2000) 11102-11107.
- Ronen, G., Cohen, M., Zamir, D. y Hirschberg, J. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant Delta. *Plant J.* 17 (1999) 341-351.
- Rosell, C.M., Brites, C.M., Pérez, E. y Gularte, M. (2007) Arroz. En "De tales panes tales harinas". León, A.E. y Rosell, C.M. (Eds), Hugo Báez (Editorial) Córdoba (Argentina), Cap. 3, pag. 123-160.
- Royo, C., Elias, E.M. y Manthey, F.A. 2009. Durum wheat breeding. En "Handbook of Plant Breeding". Prohens, J., Carena, M.J. y Nuez, F. (Eds). Springer (Editorial), Vol. 3, pag. 199-226.
- Rubio-Díaz, D.E., Santos, A., Francis, D.M. y Rodríguez-Saona, L.E. Carotenoids stability during production and storage of tomato juice made from tomatoes with diverse pigment profiles measured by infrared spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 8692-8698.
- Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W.M.H., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M.J.B. y Moorman, A.F.M. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) e45
- Ruiz-Sola, M.A. y Rodríguez-Concepción, M. (2012). Carotenoid biosynthesis in *Arabidopsis*: A colorful pathway. En "The Arabidopsis book". American Society of Plant Biologists, Vol. 10, e0158.
- Salas-Fernández, M.G., Hamblin, M.T., Li, L., Rooney, W.L., Tuinstra, M.R. y Kresovich, S. Quantitative trait loci analysis of endosperm color and carotenoid content in *Sorghum* grain. *Crop Sci.* 48 (2008) 1732-1743.
- Sander, L.C., Sharpless, K.E. y Pursch, M. C₃₀ Stationary phases for the analysis of food by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 880 (2000) 189-202.
- Sandmann, G. Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. *Arch. Biochem. Biophys.* 385 (2001a) 4-12.
- Sandmann, G. Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants. *Eur. J. Biochem.* 223 (1994) 7-24.

- Sandmann, G. Evolution of carotene desaturation: The complication of a simple pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* 483 (2009) 169-174.
- Sandmann, G. Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis: strategies, problems and achievements. *Trends Plant Sci.* 6 (2001b) 14-17.
- Sandmann, G. Molecular evolution of carotenoid biosynthesis from bacteria to plants. *Physiol. Plant.* 116 (2002) 431-440.
- Sandmann, G., Römer, S. y Fraser, P.D. Understanding carotenoid metabolism as a necessity for genetic engineering of crop plants. *Metab. Eng.* 8 (2006) 291-302.
- Santra, M., Rao, V.S. y Tamhankar, S.A. Modification of AACC procedure for measuring β -carotene in early generation durum wheat. *Cereal Chem.* 80 (2003) 130-131.
- Santra, M., Santra, D.K., Rao, V.S., Taware, S.P. y Tamhankar, S.A. Inheritance of β -carotene concentration in durum wheat (*Triticum turgidum* L. ssp. *durum*). *Euphytica* 144 (2005) 215-221.
- Sarkar, P y Stebbins, G. Morphological evidence concerning the origin of the B genome in wheat. *Am. J. Bot.* 43 (1955) 297-304.
- Saxena, A., Maity, T., Raju, P.S. y Bawa, A.S. Degradation kinetics of colour and total carotenoids in jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) bulb slices during hot air drying. *Food Bioprocess Tech.* 5 (2012) 672-679.
- Schalch, W., Cohn, W., Barker, F.M., Köpcke, W., Mellerio, J., Bird, A.C., Robson, A.G., Fitzke, F.F. y Van Kuijk, F. J.G.M. Xanthophyll accumulation in the human retina during supplementation with lutein or zeaxanthin - the LUXEA (LUtein Xanthophyll Eye Accumulation) study. *Arch. Biochem. Biophys.* 458 (2007) 128-135.
- Schemske, D.W. y Bradshaw, H.D. Pollinator preference and the evolution of floral traits in monkeyflowers (*Mimulus*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 11910-11915.
- Schieber, A. y Carle, R. Occurrence of carotenoids cis-isomers in food: Technological, analytical, and nutritional implications. *Trends Food Sci. Technol.* 16 (2005) 416-422.
- Schiedt, K. (1998) Absorption and metabolism of carotenoids in birds, fish and crustaceans. En "Carotenoids, vol. 3: Biosynthesis". Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (eds.), Birkhäuser, Verlag Basel, Switzerland, Cap. 7, pag. 285-358.
- Schneider, A., Molnár, I. y Molnár-Láng, M. Utilisation of *Aegilops* (goatgrass) species to widen the genetic diversity of cultivated wheat. *Euphytica* 163 (2008) 1-19.
- Schoch, S. y Ihl, M. Substrate specificity of chlorophyllase from different plants. *Z Naturforsch C* 53 (1998) 21-26.
- Schürmann, P. y Jacquot, J.P. Plant thioredoxin systems revisited. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51 (2000) 371-400.
- Schwartz, S.H., Tan, B.C., Gage, D.A., Zeevaart, J.A.D. y McCarty, D.R. Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science.* 276 (1997) 1872-1874.
- Schweiggert, U., Kammerer, D.R., Carle, R., y Schieber, A. Characterization of carotenoids and carotenoid esters in red pepper pods (*Capsicum annuum* L.) by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 2617-2628.
- Schweiggert, U., Kurz, C., Schieber, A. y Carle, R. Effects of processing and storage on the stability of free and esterified carotenoids of red peppers (*Capsicum annuum* L.) and hot chilli peppers (*Capsicum frutescens* L.). *Eur. Food Res. Technol.* 225 (2007) 261-270.
- Scott, C. y Eldridge, A. Comparison of carotenoid content in fresh, frozen and canned corn. *J. Food Compos. Anal.* 18 (2005) 551-559.
- Selim, K., Tsimidou, M. y Biliaderis, C.G. Kinetic studies of degradation of saffron carotenoids encapsulated in amorphous polymer matrices. *Food Chem.* 71 (2000) 199-206.
- Sellappan, K., Datta, K., Parkhi, V. y Datta, S. Rice caryopsis structure in relation to distribution of micronutrients (iron, zinc, β -carotene) of rice cultivars including transgenic indica rice. *Plant Sci.* 177 (2009) 557-562.
- Seo, M. y Koshiba, T. Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci.* 7 (2002) 41-48.

- Serpen, A. y Gökmen, V. A proposed mechanism for the inhibition of soybean lipoxygenase by β -carotene. *J. Sci. Food Agric.* 86 (2006) 401-406.
- Serpen, A., Gökmen, V., Karagöz, A. y Köksel, H. Phytochemical quantification and total antioxidant capacities of Emmer (*Triticum dicoccon* Schrank) and Einkorn (*Triticum monococcum* L.) wheat landraces. *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 7285-7292.
- Sharma, S.K. y Le Maguer, M. kinetics of lycopene degradation in tomato pulp solids under different processing and storage conditions. *Food Res. Int.* 29 (1996) 309-315.
- Sharoni Y., Linnewiel-Hermoni, K., Khanin, M., Salman, H., Veprik, A., Danilenko, M. y Levy, J. Carotenoids and apocarotenoids in cellular signaling related to cancer: A review. *Mol. Nutr. Food Res.* 56 (2012) 259-269.
- Shewmaker, C.K., Sheehy, J.A., Daley, M., Colburn, S. y Ke, D.Y. Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *Plant J.* 20 (1999) 401-412.
- Shewry, P.R., Popineau, Y., Lafiandra, D. y Belton, P. Wheat glutenin subunits and dough elasticity: findings of the EUROWHEAT project. *Trends Food Sci. Technol.* 11 (2001) 433-441.
- Shewry, P.R., D'Ovidio, R., Lafiandra, D., Jenkins, J.A., Clare Mills, E. N. y Békés, F. (2009). Wheat Grain Proteins. En "WHEAT: Chemistry and Technology Fourth Edition". Khan, K., Shewry, P.R. (Eds.) AACC International, Inc. St. Paul, Minnesota, U.S.A. Cap 8, pp. 223-298.
- Shi, J. y Le Maguer, M. Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. *Crit. Rev. Biotechnol.* 20 (2000) 293-334.
- Shi, X.M. y Chen, F. Stability of lutein under various storage conditions. *Nahrung* 41 (1997) 38-41.
- Shumskaya, M. y Wurtzel, E.T. The carotenoid biosynthetic pathway: thinking in all dimensions. *Plant Sci.* 208 (2013) 58-63.
- Shumskaya, M., Bradbury, L.M.T., Monaco, R.R. y Wurtzel, E.T. Plastid localization of the key carotenoid enzyme phytoene synthase is altered by isozyme, allelic variation, and activity. *Plant cell* 24 (2012) 3725-3741.
- Siebenhandl, S., Grausgruber, H., Pellegrini, N., Del Rio, D., Fogliano, V., Pernice, R. y Berghofer, E. Phytochemical profile of main antioxidants in different fractions of purple and blue wheat, and black barley. *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 8541-8547.
- Siedow, J.N. Plant Lipoxygenase: structure and function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42 (1991) 145-188.
- Sies, E. y Stahl, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am. J Clin. Nutr.* 62 (1995) 1315S-1321S.
- Simkin, A., Kuntz, M., Moreau, H. y McCarthy, J. Carotenoid profiling and the expression of carotenoid biosynthetic genes in developing coffee grain. *Plant Physiol. Biochem.* 48 (2010) 434-442.
- Singh, A., Reimer, S., Pozniak, C.J., Clarke, F.R., Clarke, J.M., Knox, R.E. y Singh, A.K. Allelic variation at psy-A1 and association with yellow pigment in durum wheat grain. *Theor. Appl. Genet.* 118 (2009) 1539-1548.
- Singh, S., Gamlath, S. y Wakeling, L. Nutritional aspects of food extrusion: a review. *Int. J. Food Sci Technol.* 42 (2007) 916-929.
- Skibsted, L. H. Carotenoids in antioxidant networks. Colorants or radical scavengers. *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 2409-2417.
- Slade, A.J. y Knauf, V.C. TILLING moves beyond functional genomics into crop improvement. *Transgenic Res.* 14 (2005) 109-115.
- Solovchenko, A.E., Avertcheva, O.V. y Merzlyak, M.N. Elevated sunlight promotes ripening-associated pigment changes in apple fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 40 (2006) 183-189.
- Stalberg, K., Lindgren, O., Ek, B. y Höglund, A. Synthesis of ketocarotenoid in the seed of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 36 (2003) 771-779.
- Stauffer, C.E. (1990). Functional Additives for Bakery Foods. Van Nostrand Reinhold, USA.
- Steinmuller, D. y Tevini, M. Composition and function of plastoglobuli. 1. Isolation and purification from chloroplasts and chromoplasts. *Planta* 163 (1985) 201-207.

- Stelmach, B.A., Müller, A., Hennig, P., Gebhardt, S., Schubert-Zsilavecz, M. y Weiler, E.W. A. Novel class of oxylipins, *sn1-O*-(12-oxophytodienoyl)-*sn2-O*-(hexadecatrienoyl)-monogalactosyl diglyceride, from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 12832-12838.
- Strain, H.H. (1996). Fat soluble chloroplast pigments: their identification and distribution in various Australian plants. En "Biochemistry of chloroplast, vol. I". Ed. Goodwin T.W., pp. 387-406. Academic press, New York & London.
- Subagio, A., Wakaki, H. y Morita, N. Stability of lutein and its myristate esters. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63 (1999) 1784-1786.
- Subagio, A., y Morita, N. Preparation of lutein from marigold flowers and esterification to their myristates. *Anal. Sci.*, 13 (1997) 1025-1028.
- Sun, Z., Gantt, E. y Cunningham, F.X. Cloning and functional analysis of the b-carotene hydroxylase of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 24349-52.
- Suryanarayana Rao, K., Rukmini, C. y Mohan, V.S. Carotene content of some yellow-endosperm varieties of sorghum. *Indian J. Agric. Sci.* 38 (1968) 368-372.
- Susuki, T., Honda, Y. y Mukasa, Y. Purification and characterization of lipase in buckwheat seed. *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 7407-7411.
- Svensson, I., Wehtje, E., Adlercreutz, P. y Mattiasson, B. Effects of water activity on reaction rates and equilibrium positions in enzymatic esterifications. *Biotech. Bioeng.* 44 (1994) 549-556.
- Tan, B.C., Schwartz, S.H., Zeevaart, J.A.D. y McCarty, D.R. Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 12235-12240.
- Tan, J., Baisakh, N., Oliva, N., Parkhi, V., Rai, M., Torrizo, L., Datta, K. y Datta, S.K. The screening of rice germplasm, including those transgenic rice lines which accumulate β -carotene in their polished seeds, for their carotenoid profile. *Int. J. Food Sci. Technol.* 40 (2005) 563-569.
- Tang, Y.C. y Chen, B.H. Pigment change of freeze-dried carotenoid powder during storage. *Food Chem.* 69 (2000) 11-17.
- Tardy, F. y Havaux, M. Thylakoid membrane fluidity and thermostability during the operation of the xanthophylls cycle in higher-plant chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1330 (1997) 179-193.
- Taungbodhitham, A.K., Jones, G.P., Wahlquist, M.L., y Briggs, D.R. Evaluation of extraction method for the analysis of carotenoids in fruits and vegetables. *Food Chem.* 63 (1998) 577-584.
- Taylor, M. y Ramsay, G. Carotenoid biosynthesis in plant storage organs: recent advances and prospects for improving plant food quality. *Physiol. Plant.* 124 (2005) 143-151.
- Tee, E. y Lim, C. The analysis of carotenoids and retinoids: A review. *Food Chem.* 41 (1991) 147-193.
- Teicher, V.B., Kucharski, N., Martin, H., Van der Saag, P., Sies, H. y Stahl, W. Biological Activities of apo-canthaxanthinoic acids related to gap junctional communication. *Arch. Biochem. Biophys.* 365 (1999) 150-155.
- Tian, L., Musetti, V., Kim, J., Magallanes-Lundback, M. y Dellapenna, D. The *Arabidopsis* LUT1 locus encodes a member of the cytochrome P450 family that is required for carotenoid ϵ -ring hydroxylation activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 402-407.
- Tian, Q., Duncan, C.J., y Schwartz, S.J. Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry and in-source fragmentation of lutein esters. *J. Mass Spectrom.* 38 (2003) 990-995.
- Tobes, N., Ballesteros, J., Martínez, C., Lovazzano, G., Contreras, D., Cosio, F., Gastó, J. y Martín, L.M. Collection mission of *H. chilense* Roem. et Schult. in Chile and Argentina. *Genet. Resour. Crop. Ev.* 42 (1995) 211-216.
- Toenniessen, G.H. Crop Genetic improvement for enhanced human nutrition. *J. Nutr.* 132 (2002) 2943S-2946S.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E. y Rodríguez-Concepción, M. Direct regulation of phytoene synthase gene expression and carotenoid biosynthesis by phytochrome-interacting factors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 107 (2010) 11626-11631.
- Tonon, R.V., Baroni, A.F. y Hubinger, M.D. Osmotic dehydration of tomato in ternary solutions: influence of process variables on mass transfer kinetics and an evaluation of the retention of carotenoids. *J. Food Eng.* 82 (2007) 509-517.

- Troccoli, A., Borelli, G.M., De Vita, P., Fares, C. y Di Fonzo, N. Durum wheat quality: a multidisciplinary concept. *J. Cereal Sci.* 32 (2000) 99-113.
- Trono, D., Pastore, D. y Di-Fonzo, N. Carotenoid dependent inhibition of durum wheat lipoxygenase. *J. Cereal Sci.* 29 (1999) 99-102.
- Tsimidou, M. Kinetic studies of saffron (*Crocus sativus* L.) quality deterioration. *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 2890-2898.
- Tzvetkova-Chevolleau, T., Hutin, C., Laurent D., Noël, L.D., Goforth, R., Carde, J., Caffarri, S., Sinning, I., Groves, M., Teulon, J., Hoffman, N.E., Henry, R., Michel Havaux, M. y Nussaumea, L. Canonical signal recognition particle components can be bypassed for posttranslational protein targeting in chloroplasts. *Plant Cell* 19 (2007) 1635-1648.
- UNICEF, (The State of The World's Children) www.un.org/en/mdg/summit2010.home.html
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R. y Leunissen, J.A.M. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) W71-W74.
- Upadhyay, S.K. (2006a). Elementary. En "Chemical kinetics and reaction dynamics". Anamaya Publishers, New Delhi (India), Cap.1, pag 1-45.
- Upadhyay, S.K. (2006b). Temperature effect on reaction rate. En "Chemical kinetics and reaction dynamics". Anamaya Publishers, New Delhi (India), Cap.2, pag 46-54.
- Updike, A. y Schwartz, S. Thermal processing of vegetables increases *cis* isomers of lutein and zeaxanthin. *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 6184-6190.
- Urquhart, A.A., Altosaar, I., Matlashewski, G.J. y Sahasrabudhe, M.R. Localization of lipase activity in oat grains and milled oat fractions. *Cereal Chem.* 60 (1983) 181-183.
- USDA (2005). US Department of Agriculture. Department of Health and Human Services. Nutrition and Your Health: Dietary Guidelines for Americans. Washington, DC.
- Vallabhaneni, R. y Wurtzel, E. Timing and biosynthetic potential for carotenoid accumulation in genetically diverse germplasm of maize. *Plant Physiol.* 150 (2009) 562-572.
- Vallabhaneni, R., Bradbury, L.M.T., Wurtzel, E.T. The carotenoid dioxygenase gene family in maize, sorghum, and rice. *Arch. Biochem. Biophys.* 504 (2010) 104-111.
- Vallabhaneni, R., Gallagher, C.E., Licciardello, N., Cuttriss, A.J., Quinlan, R.F. y Wurtzel, E.T. Metabolite sorting of a germplasm collection reveals the hydroxylase3 locus as a new target for maize provitamin A biofortification. *Plant Physiol.* 151 (2009) 1635-1645.
- Van Breemen, R.B. Liquid chromatography/mass spectrometry of carotenoids. *Pure Appl. Chem.* 69 (1997) 2061-2066.
- Van Breemen, R.B., Huang, C.R., Tan, Y., Sander, L.C. y Schilling, A.B. Liquid chromatography/mass spectrometry of carotenoids using atmospheric pressure chemical ionization. *J. Mass Spectrom.* 31 (1996) 975-981.
- Van den Berg, H., Faulks, R., Granado, H.F., Hirschberg, J. Olmedilla, B., Sandmann, G., Southon, S. y Stahl, W. The potencial for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *J. Sci. Food Agric.* 80 (2000) 880-912.
- Van het Hof, K.H., Gärtner, C., West, C.E. y Tijburg, L.B. Potential of vegetable processing to increase the delivery of carotenoids to man. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 68 (1998) 366-370.
- Van Hung, P. y Hatcher, D.W. Ultra-performance liquid chromatography (UPLC) quantification of carotenoids in durum-wheat: influence of genotype and environment in relation to the colour of yellow alkaline noodles (YAN). *Food Chem.* 125 (2011) 1510-1516.
- Van Norman, J.M. y Sieburth, L.E. Dissecting the biosynthetic pathway for the bypass1 root-derived signal. *Plant J.* 49 (2007) 619-628.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. y Speleman, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, R0034-R0034.11 (2002) 1-12.
- Varshney, R.K., Hoisington, D.A. y Tyagi, A.K. Advances in cereal genomics and applications in crop breeding. *Trends Biotechnol.* 24 (2006) 490-499.
- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L. y Oomah, B. D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 4113-4117.

- Vishnevetsky, M., Ovadis, M. y Vainstein, A. Carotenoid sequestration in plants: the role of carotenoid-associated proteins. *Trends Plant Sci.* 4 (1999) 232-235.
- Von Lintig, J. Colors with functions: elucidating the biochemical and molecular basis of carotenoid metabolism. *Ann. Rev. Nutr.* 30 (2010) 35-56.
- Voutilainen, S., Nurmi, T., Mursu, J. y Rissanen, T.H. Carotenoids and cardiovascular health. *Am. J. Clin. Nutr.* 83 (2006) 1265-1271.
- Wagner, L.A. y Warthesen, J. J. Stability of spray-dried encapsulated carrot carotenes. *J. food Sci.* 60 (1995) 1048-1053.
- Wallace, J.M. y Wheeler, E.L. Lipoxygenase from wheat. An examination of its reaction characteristics. *J. Agric. Food Chem.* 23 (1975) 146-150.
- Walter, M. W. y Purcell, A. E. Lipid autoxidation in precooked dehydrated sweet potato flakes stored in air. *J. Agric. Food Chem.* 22 (1974) 298-302.
- Walter, M.H. y Strack, D. Carotenoids and their cleavage products: Biosynthesis and functions. *Nat. Prod. Rep.*, 28 (2011) 663-692.
- Walter, M.H., Hans, J. y Strack, D. Two distantly related genes encoding 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase: differential regulation in shoots and apocarotenoid-accumulating mycorrhizal roots. *Plant J.* 31 (2002) 243-254.
- Wang, J., Zhang, L., Wei, Y., Yan, Z., Baum, B.R., Nevo, E. y Zheng, Y. Sequence polymorphisms and relationships of dimeric α -amylase inhibitor genes in the B genomes of *Triticum* and S genome of *Aegilops*. *Plant Sci.* 173 (2007) 1-11.
- Wang, L. y Flores, R.A. The effects of storage on flour quality and baking performance. *Food Rev. Int.* 15 (1999) 215-234.
- Weber, E.J. Carotenoids and tocopherols of corn grain determined by HPLC. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 8 (1987) 1129-1134.
- Weedon, B.C.L. (1971). Occurrence. En "Carotenoids". Isler, O. (Ed.), Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland, cap 2, pp. 29-59.
- Weedon, B.C.L. y Moss, G.P. (1995). Structure and nomenclature. En "Carotenoids, vol 1a, isolation and Analysis". Britton, G., Liaaen-Jensen, S. y Pfander, H. (Eds.), Birkhäuser, Basel, pp. 27-69.
- Wei, S., Li, X., Gruber, M.Y., Li, R., Zhou, R., Zebajadi, A. y Hannoufa, A. RNAi-mediated suppression of DET1 alters in seeds of *Brassica napus*. *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 5326-5333.
- Welch, R.M. y Graham, R.D. Breeding crops for enhanced micronutrient content. *Plant Soil* 245 (2002) 205-214.
- Welch, R.M. y Graham, R.D. Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *J. Exp. Bot.* 55 (2004) 353-364.
- Welsch, R., Beyer, P., Hugueney, P., Kleinig, H. y Von Lintig, J. Regulation and activation of phytoene synthase, a key enzyme in carotenoid biosynthesis, during photomorphogenesis. *Planta* 211 (2000) 846-854.
- Welsch, R., Wüst, F., Bär, C., Al-babili, S. y Beyer, P. A third phytoene synthase is devoted to abiotic stress-induced abscisic acid formation in rice and defines functional diversification of phytoene synthase genes. *Plant Physiol.* 147 (2008) 367-380.
- Welsh, S., Shaw, A. y Davis, C. Achieving dietary recommendations: Whole-grain foods in the food guide pyramid. *Crit. Rev. Food Sci.* 34 (1994) 441-451.
- Werck-Reichhart, D., Bak, S. y Paquette, S. (2002). Cytochromes P450. En "The Arabidopsis book". American Society of Plant Biologists, Vol.1, e0028.
- Werner, S. y Böhm, V. Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from pasta: evaluation of an in vitro digestion model. *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 1163-1170.
- Wesener, J.A. y Teller, G.L. Aging of flour and its effect on digestion. *J. Ind. Eng. Chem.* 3 (1911) 912-919.
- Wheat Genomics. School of Biological Sciences, University of Bristol. <http://www.wheatbp.net/>
- Whitaker, J.R. (1991). Lipoxygenases. En "oxidative enzymes in foods". D.S. Robinson y N.A.M. Eskin (ed). Elsevier Applied Science, London, UK, pp. 175-215.

- Wong, J.C., Lambert, R.J., Wurtzel, E.T. y Rocheford, T.R. QTL and candidate genes phytoene synthase and ζ -carotene desaturase associated with the accumulation of carotenoids in maize. *Theor. Appl. Genet.* 108 (2004) 349-359.
- Wright, M.E., Mayne, S.T., Swanson, C.A., Sinha, R. y Alavanja, M.C. Dietary carotenoids, vegetables, and lung cancer risk in women: the Missouri Women's Healthy Study (United States). *Cancer Cause Control* 14 (2003) 85-96.
- Wrigley, C.W. (2009). Wheat: a unique grain for the world. En "Wheat: Chemistry and Technology Fourth Edition". Khan, K., Shewry, P.R. (Eds.). AACC International, Inc. St. Paul, Minnesota, U.S.A. Cap 1, pp. 1-17.
- Wurbs, D., Ruf, S. y Bock, R. Contained metabolic engineering in tomatoes by expression of carotenoid biosynthesis genes from the plastid genome. *Plant J.* 49 (2007) 276-288.
- Wurtzel, E.T. Genomics, genetics, and biochemistry of maize carotenoid biosynthesis. *Recent Adv. Phytochem.* 38 (2004) 85-110.
- Wurtzel, E.T., Cuttriss, A. y Vallabhaneni, R. Maize provitamin A carotenoids, current resources, and future metabolic engineering challenges. *Front. Plant Sci.* 3 (2012) 29.
- Xu, J., Hu, Q., Wang, X., Luo, J., Liu, Y. y Tian, C. Changes in the main nutrients, phytochemicals, and antioxidant activity in yellow corn grain during maturation. *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 5751-5756.
- Xue, C., Fukuoka, M. y Sakai, N. Prediction of the degree of starch gelatinization in wheat flour dough during microwave heating. *J. Food Eng.* 97 (2010) 40-45.
- Yamamoto, H.Y. Biochemistry of the xanthophylls cycle in higher plants. *Pure Appl. Chem.* 51 (1979) 639-648.
- Yamamoto, H.Y. Functional roles of the major chloroplast lipids in the violaxanthin cycle. *Planta* 224 (2006) 719-724.
- Yamamoto, H.Y., Chichester, C.O. y Nakayama, T.O. Studies on light and dark interconversions of leaf xanthophylls. *Arch. Biochem. Biophys.* 97 (1962) 168-173.
- Yamazaki, J., Takahisa, S., Emiko, M., y Yasumaro, K. The stoichiometry and antenna size of the two photosystems in marine green algae, *Bryopsis maxima* and *Ulva pertusa*, in relation to the light environment of their natural habitat. *J. Exp. Bot.* 56 (2005) 1517-1523.
- Yanishlieva, N. V., Aitzetmüller, K. y Raneva, V. G. β -Carotene and lipid oxidation. *Fett Lipid* 100 (1998) 444-462.
- Ye, X., Al-Babili, S., Klöti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beber, P. y Potrykus, I. Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287 (2000) 303-305.
- Yonekura, L. y Nagao, A. Intestinal absorption of dietary carotenoids. *Mol. Nutr. Food Res.* 51 (2007) 107-115.
- Young, J.C., Abdel-Aal, E.S.M., Rabalski, I. y Blackwell, B.A. Identification of synthetic regioisomeric lutein esters and their quantification in a commercial lutein supplement. *J. Agric. Food Chem.*, 55 (2007) 4965-4972.
- Yu, B., Lydiate, D.J., Young, L.W., Schäfer, U.A. y Hannoufa, A. Enhancing the carotenoid content of *Brassica napus* seeds by downregulating lycopene epsilon cyclase. *Transgenic Res.* 17 (2008) 573-585.
- Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J. y Qian, M. Free radical scavenging properties of wheat extracts. *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 1619-1624.
- Yu, Q., Ghisla, S., Hirschberg, J., Varda Mann, V. y Beyer, P. Plant carotene *cis-trans* isomerase CRTISO a new member of the fadred-dependent flavoproteins catalyzing non-redox reactions. *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 8666-8676.
- Yu, Q., Schaub, P., Ghisla, S., Al-Babili, S., Krieger-Liszkay, A. y Beyer, P. The Lycopene cyclase CrtY from *Pantoea ananatis* (formerly *Erwinia uredovora*) catalyzes a FADred-dependent non-redox reaction. *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 12109-12120.
- Yuan, J. P. y Chen, F. Hydrolysis kinetics of astaxanthin esters and stability of astaxanthin of *Haematococcus pluvialis* during saponification. *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 31-35.

- Zadoks, J.C., Chang, T.T. y Konzak, C.F. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Res.* 14 (1974) 415-421.
- Zagalsky, P.F. Invertebrate carotenoproteins. *Method Enzymol.* 111 (1985) 216-216.
- Zamir, D. Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nat. Rev. Genet.* 2 (2001) 983-989.
- Zechmeister, L. y Cholnoky, L. Carotenoids of Hungarian wheat flour. *J. Biol. Chem.* 135 (1940) 31-36.
- Zepka, L.Q., Borsarelli, C.D., Azevedo, M.A., Da Silva, P. y Mercadante, A.Z. Thermal degradation kinetics of carotenoids in a cashew apple juice model and its impact on the system color. *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 7841-7845.
- Zhang, W. y Dubcovsky, J. Association between allelic variation at the *phytoene synthase 1* gene and yellow pigment content in the wheat grain. *Theor. Appl. Genet.* 116 (2008) 635-645.
- Zhang, W., Lukaszewski, A.J., Kolmer, J., Soria, M.A., Goyal, S. y Dubcovsky, J. Molecular characterization of durum and common wheat recombinant lines carrying leaf rust resistance (*Lr19*) and yellow pigment (*Y*) genes from *Lophopyrum ponticum*. *Theor. Appl. Genet.* 111 (2005) 573-582.
- Zhou, K. Su, L. y Yu, L. Phytochemicals and antioxidant properties in wheat bran. *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004b) 6108-6114.
- Zhou, K. y Yu, L. Antioxidant properties of bran extracts from trego wheat grown at different locations. *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004a) 1112-1117.
- Zhou, K. y Yu, L. Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. *Lebensm.-Wiss.-Technol.* 37 (2004b) 717-721.
- Zhou, K., Laux, J.J. y Yu, L. Comparison of swiss red wheat grain fractions for their antioxidant properties. *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004a) 1118-1123.
- Zhu, C., Bai, C., Sanahuja, G., Yuan, D., Farré, G., Naqvi, S., Shi, L., Capell, T. y Christou, P. The regulation of carotenoid pigmentation in flowers. *Arch. Biochem. Biophys.* 504 (2010) 132-141.
- Zhu, C., Naqvi, S., Breitenbach, J., Sandmann, G., Christou, P. y Capell, T. Combinatorial genetic transformation generates a library of metabolic phenotypes for the carotenoid pathway in maize. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 105 (2008) 18232-18237.
- Ziegler, E. y Greer, E.N. (1971). Wheat flour milling. En: Wheat Chemistry and Technology. Pomeranz, Y. (Ed.), American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, pp. 134-143.
- Žilić, S., Dodig, D., Šukalović, V.H. Maksimović, M., Saratlić, G. y Škrbić, B. Bread and durum wheat compared for antioxidants contents, and lipoxygenase and peroxidase activities. *Int. J. Food Sci. Technol.* 45 (2010) 1360-1367.
- Žilić, S., Serpen, A., Akilloğlu, G., Janković, M. y Gökmen, V. Distribution of phenolic compounds, yellow pigments and oxidative enzymes in wheat grains and their relation to antioxidant capacity of bran and debranned flour. *J. Cereal Sci.* 56 (2012) 562-568.
- Žnidarčič, D., Ban, D. y Šircelj, H. Carotenoid and chlorophyll composition of commonly consumed leafy vegetables in Mediterranean countries. *Food Chem.* 129 (2011) 1164-1168.